ZELLKULTUREN AUS VERSCHIEDENEN SÜSSWASSERTELEOSTEERGEWEBEN UND UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄTIOLOGIE DER SCHWIMMBLASENENTZÜNDUNG DER KARPFEN

WINFRIED AHNE

1973

Dipl.-Kfm. A. Koch
(Kurfürstendruck)
8 München 23
Clemensstraße 27
Telefon 342149

Aus dem Institut für
Strömungen und Infektionsspektralien der Zellen
der Zoologischen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr.Dr.h.c. A. Hoff

und

Aus dem Zoologisch-Parasitologischen Institut
der Universität München
Vorstand: Professor Dr.Dr.h.c. H. Lichtenau

[illegible]
[illegible]
[illegible]
[illegible]

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der
Doktorwürde der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Winfried Ohm
aus
Tetschen/Sudetenland

München 1973

Aus dem Institut für
Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr.Dr.h.c. A. Mayr

und

aus dem Zoologisch-Parasitologischen Institut
der Universität München
Vorstand: Professor Dr.Dr.h.c. H. Liebmann

ZELLKULTUREN AUS VERSCHIEDENEN SÜSSWASSERTELEOSTEERGEWEBEN UND UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄTIOLOGIE DER SCHWIMMBLASENENTZÜNDUNG DER KARPFEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der
Doktorwürde der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Winfried Ahne
aus
Tetschen/Sudetenland

München 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr
Korreferenten: Prof.Dr.Dr.h.c. H. Liebmann
Prof.Dr. H. Reichenbach-Klinke
Fachvertreter: Prof.Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.1973

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	DIE ZÜCHTUNG VON ZELLKULTUREN AUS FISCHGEWEBE	2
A	SCHRIFTTUM	2
1.	Geschichtliche Entwicklung	2
2.	Übersicht über bisher gemachte Erfahrungen bei der Züchtung von Fischgeweben *in vitro*	4
2.1.	Verwendete Fischarten	4
2.2.	Anzüchtung von Zellen verschiedener Gewebe und Organe	10
2.2.1.	Auswahl und Präparation des Anzuchtmaterials	10
2.2.2.	Explantatkulturen	12
2.2.3.	Einschichtzellkulturen	15
2.2.3.1.	Primärkulturen	15
2.2.3.1.1.	Aufschluß der Gewebe	15
2.2.3.1.2.	Zelleinsaat und Subkulturen	17
2.2.3.2.	Zell-Linien	18
2.3.	Nährstoffbedürfnisse der *in vitro* kultivierten Fischzellen	22
2.3.1.	Salzlösungen	22
2.3.1.1.	Süßwasserteleostei	23
2.3.1.2.	Marine Teleostei	23
2.3.1.3.	Marine Elasmobranchii	25
2.3.1.4.	Cyclostomata	25
2.3.2.	Fischzellkulturmedien und deren Zusätze	25
2.3.2.1.	Zellkulturmedien	25
2.3.2.2.	Medienzusätze	26
2.4.	Biologie der Fischzellen *in vitro*	29
2.4.1.	Morphologie und Vermehrung	29
2.4.2.	Temperaturansprüche	31
2.4.3.	pH-Anforderungen	32

Seite

2.5. Zellkulturlagerung bei niederen Temperaturen und Tiefgefrierkonservierung von Zellen 33

2.5.1. Zellkulturlagerung bei niederen Temperaturen 33

2.5.2. Tiefgefrierkonservierung von Zellen 33

B EIGENE UNTERSUCHUNGEN 36

1. Material und Methoden 36

1.1. Herstellung von primären Einschichtzellkulturen 36

1.1.1. Organ- und Gewebeauswahl 36

1.1.1.1. Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) 36

1.1.1.2. Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.) 36

1.1.2. Salzlösungen und Zellkulturmedien 36

1.1.3. Präparation der Gewebe 41

1.1.4. Gewebedissoziation 42

1.1.5. Weiterbehandlung der aufgeschlossenen Zellen 43

1.1.6. Inkubationstemperaturen 44

1.1.7. Verwendung organischer Puffer im Nährmedium mit verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen 44

1.2. Subkulturen 46

1.3. Zell-Linien 46

1.4. Lagerung und Konservierung von Zellen und Gewebe 47

1.4.1. Lagerung von suspendierten Zellen und Einschichtzellkulturen bei 4°C 47

1.4.2. Konservierung von Zellen und Gewebe bei -70°C 47

1.5. Histologische Untersuchungen 48

1.5.1. Herstellung von Zellkulturpräparaten 48

1.5.2. Chromosomendarstellung 50

Seite

2. Ergebnisse 52

2.1. Kulturansatz aus Gewebe der Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) 52

2.1.1. Anzüchtbarkeit verschiedener Gewebearten 52

2.1.2. Gewebedissoziation 55

2.1.3. Zelleinsaatmenge 59

2.1.4. Zellwachstum bei verschiedenen Temperaturen 60

2.1.5. Zellvermehrung mit verschiedenen Medien 62

2.1.6. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration der Nährmedien auf das Zellwachstum 66

2.1.7. Subkulturen 68

2.2. Kulturansatz aus Gewebe des Karpfens (C y p r i n u s c a r p i o L.) 69

2.2.1. Anzüchtbarkeit verschiedener Gewebearten 69

2.2.2. Gewebedissoziation 73

2.2.3. Zelleinsaatmenge 77

2.2.4. Zellwachstum bei verschiedenen Temperaturen 78

2.2.5. Zellvermehrung mit verschiedenen Medien 79

2.2.6. Subkulturen 81

2.3. Rezept für die routinemäßige Herstellung von primären Zellkulturen aus Forellen- und Karpfengewebe 82

2.4. Zellkulturen aus dem Gewebe von bei 4°C gelagerten Fischen 84

2.5. Zellkulturen aus bei -70°C konserviertem Gewebe 84

2.6. Lagerung und Konservierung von Zellen 85

2.6.1. Lagerung von suspendierten Zellen und Einschichtzellkulturen 85

2.6.1.1. Bei Zuchttemperatur 85

2.6.1.2. Bei 4°C 85

2.6.2. Einfrieren von Zellen 85

Seite

2.7. Züchtung und Haltung von Zell-Linien 86

2.8. Chromosomendarstellung 87

C BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 90

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄTIOLOGIE DER SCHWIMMBLASENENTZÜNDUNG DER KARPFEN 95

A VORBEMERKUNGEN 95

B SCHRIFTTUM 96

1. Infektiöse Bauchwassersucht der Karpfen (IBW) 96

1.1. Ätiologie 96

1.2. Klinische Erscheinungen und Verlauf 98

1.3. Pathologische Veränderungen 101

2. Schwimmblasenentzündung der Karpfen (SBE) 103

2.1. Ätiologie 103

2.2. Klinische Erscheinungen und Verlauf 105

2.3. Pathologische Veränderungen 107

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN 111

1. Material und Methoden 111

1.1. Virusisolierung 111

1.1.1. Herkunft und Aufarbeitung des Organmaterials 111

1.1.2. Zellkulturen 112

1.1.3. Verimpfung und Passierung des Materials 113

1.2. Charakterisierung des Isolates 114

1.2.1. Vermehrung in Zellkulturen 114

1.2.1.1. Titrationen 114

1.2.1.2. Vermehrung bei verschiedenen Temperaturen 115

1.2.1.3. Einschrittvermehrungskurve 115

1.2.1.4. Plaquebildung 116

1.2.2. Hämagglutinationstest, Immunserumherstellung 117

1.2.3. Tierversuche 118

1.2.4. Viruskonzentration, Bestimmung der Dichte und Elektronenmikroskopie 119

Seite

1.2.5. Ultrafiltration 120

1.2.6. Chloroformbehandlung 120

1.2.7. pH-Empfindlichkeit 120

1.2.8. Wärmebehandlung 121

1.2.9. Bestimmung des Nucleinsäuretypes 121

2. Ergebnisse 122

2.1. Virusisolierung und -vermehrung in Fisch- und Warmblüterzellkulturen 122

2.1.1. Virusisolierung 122

2.1.2. Virusvermehrung in Fischzellkulturen 124

2.1.3. Virusvermehrung in Warmblüterzellkulturen 125

2.2. Charakterisierung des Isolates 127

2.2.1. Vermehrung bei verschiedenen Temperaturen 127

2.2.2. Einschrittvermehrungskurve 128

2.2.3. Plaquebildung 129

2.2.4. Hämagglutination, serologische Reaktionen 131

2.2.5. Tierversuche 131

2.2.5.1. Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.) 131

2.2.5.2. Giebel (C a r a s s i u s a u r a t u s g i b e l i o Bl.) 135

2.2.5.3. Guppy (L e b i s t e s r e t i c u l a t u s P.) 135

2.2.6. Viruskonzentration, Bestimmung der Dichte und Elektronenmikroskopie 136

2.2.6.1. Viruskonzentration 136

2.2.6.2. Bestimmung der Dichte 136

2.2.6.3. Elektronenmikroskopie 137

2.2.7. Ultrafiltration 138

2.2.8. Chloroformbehandlung 138

2.2.9. pH-Empfindlichkeit 138

Seite

2.2.10. Wärmebehandlung 139

2.2.11. Bestimmung des Nucleinsäuretypes 139

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 141

IV. ZUSAMMENFASSUNG 145

V. LITERATURVERZEICHNIS 149

A Zu: Züchtung von Zellkulturen aus Fischgewebe 149

B Zu: Untersuchungen über die Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen 162

I. EINLEITUNG

Der Fisch gewinnt als Proteinlieferant ständig an Bedeutung. Die Nutzfischproduktion erfährt deshalb heute eine starke Intensivierung, die mit einem Ansteigen von Fischkrankheiten verbunden ist. Besonders Infektionskrankheiten mit vermutlicher Virusätiologie breiten sich seuchenhaft in Fischbeständen aus und fügen der Nutzfischhaltung und -zucht schwere Verluste zu.

Dem stehen nur empirisch erarbeitete Methoden zur Diagnostik und Erforschung der als Seuchenerreger vermuteten oder bekannten Fischviren gegenüber. Bei der Suche nach geeigneten Methoden der Fischzell- und Gewebekultivierung wurde festgestellt, daß im wesentlichen die Verfahrenstechniken der Warmblüterzellzucht auch für die Zellzüchtung aus Kaltblütergewebe anwendbar sind.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es daher, anhand der Literatur einen Überblick über bereits verwendete Techniken zu erarbeiten sowie Verfahren zu entwickeln, mit denen Fischzellkulturen routinemäßig unter Praxisbedingungen für die Diagnose von Fischviruskrankheiten hergestellt werden können.

Mit den erarbeiteten Methoden zur Fischzellkultur-Herstellung sollten ferner Untersuchungen zur Aufklärung der Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen (SBE) durchgeführt werden.

II. DIE ZÜCHTUNG VON ZELLKULTUREN AUS FISCHGEWEBE

A Schrifttum

1. Geschichtliche Entwicklung

Die ersten Explantatkulturen von Fischorganen dienten zunächst dem Studium physiologischer Funktionen von Organen und Geweben außerhalb des Organismus.

Während bei den Untersuchungen von OSOWSKI (1914), LEWIS (1916), DEDERER (1921), GOODRICH (1924) u.a. hauptsächlich das Überleben der Explantate in einer Nährlösung (z.B. Meerwasser mit Fischboullion, homologen Organextrakten, Kaninchenplasma) im Vordergrund standen, waren die Bemühungen in der Folgezeit mehr und mehr auf das Erzielen einer Zellvermehrung unter *in vitro* Bedingungen ausgerichtet.

CHLOPIN (1925, 1928) berichtete erstmalig über eine Zellvermehrung, die an den Rändern von Organexplantaten (Milz, Leber u.a.) verschiedener Fischarten (*Petromyzon spec.*, *Esox lucius* L., *Carassius carassius* L.) in einem mit Fischmilzextrakt verdünntem Kaninchenserum auftrat.

Um das Zellwachstum weiter zu fördern, benutzten LEWIS und MAC NEAL (1935) die von HARRISON (1907, 1910) entwickelte "hanging drop"-Methode.

PFEIFFER (1935) gelang es mit diesem Kultivierungsverfahren aus Milz- und Leberfragmenten des *Petromyzon fluviatilis* (L.) ein nahezu gleichmäßiges Zellwachstum zu erzielen. Der Autor verwendete als Nährmedium Fischmilzextrakt in verdünntem Kaninchenplasma und inkubierte die Explantate bei 16-18°C bzw. 22-24°C. Weitere Fortschritte wurden durch den Einsatz von Antibiotika (z.B. Penicillin) (GRAND und CAMERON, 1948) in der Nährlösung sowie durch die Verwendung von Zellkulturflaschen (Carrel-Flaschen) erzielt.

Durch die Einführung von Mammalierzellkulturmedien, z.B. Medium 199, (SCHLUMBERGER, 1949; SORET und SANDERS, 1954; SANDERS und SORET, 1954) erhielt die Fischgewebekulturtechnik neue Impulse.

GRÜTZNER (1956 a) berichtete erstmals über vergleichende Studien der Explantatkultivierung von Fischgewebe und deren Verwendung in der Fischvirologie. Die Autorin ermittelte in einer Anzahl von Versuchen die optimale Dosis von Embryonalextrakt (45 %) in der Nährlösung (40 % Hammelserum, 15 % aqua bidest.), testete weiterhin Seren von Menschen, Hammeln und Fischen (Schleie und Karpfen) als Wachstumsstimuli aus, wobei sich herausstellte, daß Fischserum gegenüber den isotonisch verdünnten Warmblüterseren keinen Vorteil zu bieten schien. Zellen jugendlicher und embryonaler Gewebe der Warmwasseraquarienfische Macropodus opercularis (L.), und Lebistes reticulatus (P.) wuchsen in verdünntem koaguliertem Hühnerplasma als Gerüstsubstanz (Plasma-Gel-Methode) bei 26-28°C schnell aus und konnten über mehrere (3-6) Wochen gehalten werden.

Schließlich gelang es WOLF (1956), WOLF et al. (1957), aus Gewebeexplantaten mehrerer Fischarten (Salmo gairdneri Rich., Salmo trutta, L., Salvelinus fontinalis, Mitch., Carassius carassius auratus, L.) Zellen über längere Zeiten hinweg (meist länger als 65 Tage) zu kultivieren.

Mit einer Nährlösung, bestehend aus
20 % Serum (von Warmblütern oder Fischen), 30 % Medium 199,
45 % Earle'sche Salzlösung, 5 % Hühnerembryonalextrakt,
konnte aus Niere, Milz, Peritoneum, Kiemen, Gonaden, Flossen, Schwimmblasen, - weniger gut aus Herz und Leber -, bei einer Inkubationstemperatur von 19-22°C ein geschlossener Zellrasen erzielt werden. Weiterhin beobachteten die Autoren ausgezeichnete Wachstumsresultate mit jeweils 20 % menschlichem oder homologem Serum bzw. mit Rinderamnionflüssigkeit im Medium.

Eine neue Aera der Fischgewebekulturtechnik begann als GRÜTZNER (1958) erstmals trypsinierte Einschichtzellkulturen nach der Methode von DULBECCO und VOGT (1954) aus Leber- und Nierengewebe der T i n c a t i n c a (L.) (Schleie) herstellen konnte. Die Autorin verwendete zum Gewebeaufschluß Trypsin 1:250 in isotonisch mit aqua dest. verdünnter (1:4) PBS (=Phosphate Buffered Saline) nach DULBECCO und VOGT (1954). Die bei 20°C fraktioniert aufgeschlossenen Zellen wuchsen mit einer isotonisch verdünnten (1:4) Nährlösung, bestehend aus Medium 199 (MORGAN et al., 1950) oder Rinderamnionflüssigkeit mit 15-30 % Kälberserum und Antibiotika (100 I.E. Penicillin, 100 Gamma Streptomycin/ml) bei einer Inkubationstemperatur von 26°C nach 5-6 Tagen zu einem einschichtigen Rasen aus. Die Zellen dichtgewachsener Kulturen ließen sich mit der Trypsinlösung wieder von der Wachstumsunterlage ablösen und konnten erfolgreich subkultiviert werden.

Mit dieser schnell aufgegriffenen Methode gelang es schließlich WOLF und QUIMBY (1962) die erste Fischzell-Linie (RTG-2) aus Zellen von Regenbogenforellengonaden zu etablieren.

2. Übersicht über bisher gemachte Erfahrungen bei der Züchtung von Fischgeweben i n v i t r o

2.1. Verwendete Fischarten

Von den etwa 25 000 existierenden Fischarten leben die meisten im Meer, etwa 5000 im Süßwasser (REICHENBACH-KLINKE, 1970).

Zur Zell- und Gewebekultivierung wurden hauptsächlich O s t e i c h t h y e s (Süß- und Salzwasser-Teleosteer) aber auch P e t r o m y z o n e s (Cyclostomata) und C h o n d r i c h t h y e s (Elasmobranchii) herangezogen.

Für die Herstellung von Einschichtzellkulturen wurden vorwiegend Fische verschiedener Teleosteer-Ordnungen, wie die der C l u p e i f o r m e s (Heringsfische), C y p r i n i f o r m e s (Karpfenfische), C y p r i n o d o n t i f o r m e s

(Zahnkarpfen), P e r c i f o r m e s (Barsche), S a l m o - n i f o r m e s (Lachsfische) und S i l u r i f o r m e s (Welse) verwendet (Tabelle 1).

Die in der Biologie der Fische begründete Tatsache, daß diese Tiere - im Gegensatz zu den Mammaliern - während ihres gesamten Lebens ständig wachsen, kommt der Fischzell- und Gewebekultivierung zugute.

Auf die Verwendung von Gewebe embryonaler oder juveniler Fische wirkt sich erschwerend aus, daß diese nur während einer kurzen Jahresperiode zur Verfügung stehen.

Tabelle 1

Übersicht über bisher verwendete Fischarten für die Herstellung von Zell- und Explantatkulturen (in Anlehnung an WOLF und QUIMBY, 1969 b)

Klasse	Ordnung	Fischname	Explantat-Kultur	Einschichtzell-Kultur
Petromyzones (Neunaugen)		Petromyzon fluviatilis (L.)	+	-
		Mordacia mordax (L.)	+	-
Chondrichthyes (Knorpelfische)	Squaliformes (Haie)	Carcharis spec.	+	-
		Squalus acanthias (L.)	+	-
	Rajiformes (Rochen)	Raja spec.	+	-
Osteichthyes (Knochenfische)	Clupeiformes (Heringsfische)	Clupea harengus (L.)	-	+
	Salmoniformes (Lachsfische)	Oncorhynchus kisutch (Walb.)	-	+
		O. nerka (Walb.)	+	+
		O. tshawytscha (Walb.)	-	+
		Salmo gairdneri (Rich.)	+	+
		S. salar (L.)	-	+
		S. trutta (L.)	+	+
		Salvelinus fontinalis (Mitch.)	+	-
		Esox. spec.	+	-

Klasse	Ordnung	Fischname	Explantat-Kultur	Einschichtzell-Kultur
	Cypriniformes (Karpfenfische)	Carassius carassius (L.)	+	+
		Carassius carassius auratus (L.)	+	+
		Carassius auratus gibelio (Bl.)	+	+
		Cyprinus carpio (L.)	+	+
		Tinca tinca (L.)	-	+
		Brachydanio rerio (Ham.u.Buch)	-	+
		Pimephales promelas Raf.	-	+
		Ptychocheilus oregonense (Rich.)	-	+
	Siluriformes (Welse)	Ictalurus nebulosus (le Sueur)	-	+
		I. punctatus (Raf.)	-	+
	Cyprinodontiformes (Zahnkarpfen)	Fundulus heteroclitus (L.)	+	-
		Gambusia holbrooki (Gir.)	+	-
		Lebistes reticulatus (P.)	+	+
		Xiphophorus helleri (Haeckel)	+	+
		X. maculatus (Günth.)	+	+
		X. variatus (Meek)	-	+
	Gadiformes (Schellfischartige)	Gadus morhua (L.)	+	-
		Pollachius virens (L.)	+	-

Klasse	Ordnung	Fischname	Explantat-Kultur	Einschichtzell-Kultur
	Perciformes (Barsche und Sonnenbarsche)	Diplectrum formosum (L.)	-	+
		Roccus lineatus (Bl.)	+	-
		Lutjanus griseus (L.)	-	+
		Acantharchus pomotis (Baird.)	-	+
		Ambloplites rupestris (Raf.)	-	+
		Centrarchus macropterus (Lacép.)	-	+
		Chaenobryttus gulosus (Cuv.)	-	+
		Elassoma zonatum Jordan	-	+
		Enneacanthus gloriosus (Baird.)	-	+
		Lepomis auritus (L.)	-	+
		L. cyanellus (Raf.)	-	+
		L. gibbosus (L.)	-	+
		L. macrochirus Raf.	-	+
		L. microlophus (Günth.)	-	+
		Micropterus dolomieu (Lacép.)	-	+
		M. salmoides (Lacép)	-	+
		Pomoxis nigromaculatus (le Sueur)	-	+
		Anisotremus virginicus (L.)	-	+
		Haemulon flavolineatum (Desmarest)	-	+
		Haemulon sciurus (Shaw)	-	+
		Leiostomus xanthurus Lacép.	-	+
		Pomacanthus spec.	-	+
		Calamus spec.	-	+
		Cottus gobio (L.)	+	-
		Myoxocephalus scorpius (L.)	+	-

Klasse	Ordnung	Fischname	Explantat-Kultur	Einschichtzell-Kultur
		Macropodus opercularis (L.)	+	-
	Pleuronectiformes (Plattfische)	Pseudopleuronectes spec.	+	-
	Lophiiformes (Armflosser)	Lophius americanus Val.	+	-
		L. piscatorius (L.)	+	-
	Syngnathiformes (Seenadeln)	Hippocampus spec.	-	+

2.2. Anzüchtung von Zellen verschiedener Gewebe und Organe

2.2.1. Auswahl und Präparation des Anzuchtmaterials

Zur Gewinnung vermehrungsfähiger Zellen wurden verschiedene Fischgewebearten wie Gonaden, Schwimmblase, Herz, Leber, Niere, Haut und Muskeln, aber auch Magen und Darm, Cornea, Flossen, Gehirn, Kiemen sowie Tumorgewebe herangezogen. Embryonales und juveniles Gewebe weist im allgemeinen gegenüber dem der adulten Fische i n v i t r o ein besseres Zellwachstum auf und ist auch über längere Zeiträume hinweg kultivierbar.

Gonaden (Ovarien und Hoden) lassen sich im unreifen Zustand in der Regel stets von fast allen Fischarten gut anzüchten (WOLF et al., 1957, 1960, 1962; TOWNSLEY, 1963; FRYER, 1964; PFITZNER und GRÜTZNER, 1964; KUNST und FIJAN, 1966; PFITZNER und FRÖHLICH, 1966; u.a.).

Schwimmblasen können von den meisten Fischen ebenfalls mit gutem Anzuchtserfolg kultiviert werden (WOLF et al., 1957, 1960; PFITZNER, 1965; u.a.).

Herzgewebe liefert nicht in allen Fällen gute Kulturen (WOLF et al. 1957, 1960; PFITZNER, 1965; u.a.).

Lebergewebe läßt sich nur in Einzelfällen kultivieren. Den positiven Anzuchtsergebnissen von GRÜTZNER (1958) stehen negative Berichte von BABINI und GHITTINO (1961) und FRYER (1964) gegenüber. WOLF und DUNBAR (1957); CLEM et al. (1961); TOWNSLEY et al. (1963); PFITZNER (1965) konnten nur gelegentlich auswachsende Zellen beobachten.

Nieren- und Milzgewebe wurde bisher von einigen Autoren mit relativ gutem Anzuchtserfolg kultiviert. (WOLF et al. 1957, 1960; GRÜTZNER, 1958; KUNST, 1962; u.a.).

Da Haut, Flossen und Kiemen stets massiv (vorwiegend mit gramnegativen Bakterien) kontaminiert sind, gelingt es nur in einzelnen Fällen, gute Kulturen zu erzielen.

In Magen- und Darmgewebe befinden sich ebenfalls stets zahlreiche Bakterien. Es gelang bisher nicht, aus derartigem Anzuchtsmaterial kontaminationsfreie Kulturen zu erzielen (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Cornea wurde bisher nur als Explantatkultur erfolgreich gezüchtet (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Mit Tumorgewebe (Hepatom der Regenbogenforelle) gelang es FRYER et al. (1965) eine permanente Fischzell-Linie (RTH 149) herzustellen. Fischtumorzellen scheinen naturgemäß auch i n v i t r o relativ hohe Vermehrungsraten aufzuweisen (GRAND et al., 1941; GRAND und CAMERON, 1948; SCHLUMBERGER, 1949; u.a.).

Gehirn- und Nervengewebe ließ sich nur in einigen Fällen befriedigend anzüchten. (TOWNSLEY, 1963; u.a.).

Muskelgewebe konnte bisher - soweit bekannt - noch nicht i n v i t r o kultiviert werden (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Leukozyten. HECKMAN et al. (1971) berichteten über die erfolgreiche Herstellung von Leukozytenkulturen mehrerer Süßwasserteleosteer (S a l m o g a i r d n e r i Rich., C a r a s s i u s a u r a t u s L., C y p r i n u s c a r p i o L.).

Embryonen (meist von C y p r i n o d o n t i d e n und C l u p e i d e n) lieferten in vielen Fällen erfolgreiche Zellkulturen (GRÜTZNER, 1956 a; FRYER, 1965; PFITZNER, 1965; u.a.).

Zur Herstellung von Explantat- und Einschichtzellkulturen werden die Organe und Gewebe unter sterilen Bedingungen dem frisch getöteten Fisch entnommen. Hierbei scheint es unerläßlich zu sein, die Schnittflächen mit 70 % Alkohol zu

sterilisieren, da die Haut der meisten Fische Bakterien, Pilze und oft verschiedene Parasiten enthält. Die entnommenen Organe können ebenfalls bakteriell kontaminiert sein und werden deshalb in einer antibiotikahaltigen Salzlösung (PBS mit 200 I.E. Penicillin, 200 Gamma Streptomycin, 200 I.E. Polymyxin, 50 Gamma Fungizon und 50 Gamma Neomycin) unter 1-2maligem Wechsel gewaschen.
Nach Zerkleinerung können die Organ- und Gewebestückchen entweder sofort weiterverarbeitet werden oder man beläßt sie, um das Einwirken der Antibiotika zu gewährleisten, bei Temperaturen von 4-20°C zwei bis vier Stunden in frischer antibiotikahaltiger PBS-Lösung. Das so behandelte Gewebe dient entweder als Ausgangsmaterial für Explantatkulturen oder für den enzymatischen Aufschluß.

2.2.2. Explantatkulturen

(GRÜTZNER (1956 a) explantierte in Anlehnung an die Methodik der Warmblütergewebezüchtung (Plasma-Gel-Methode) mit modifizierten Nährmedien (LOCKE-LEWIS-Lösung für Kaltblüter 40 %, Hammelserum 40 % und Embryonalextrakt 20 %; ein Antibiotikazusatz schien nicht erforderlich) aseptisch entnommenes Lebergewebe, Muskulatur und Fragmente des Mesenteriums von *Macropodus opercularis* (L.) und embryonales Gewebe des *Lebistes reticulatus* (P.).
Die Auswahl geeigneter Zellgerüstsubstanzen wie verdünntes koaguliertes Hühnerplasma oder Polyvinylmembranen, ein steriles Ausgangsmaterial, die Verwendung brauchbarer Medien sowie optimale Inkubationstemperaturen (25-28°C) schienen für den Züchtungserfolg ausschlaggebend. Die Gewebestückchen wurden sowohl in Carrelschalen wie auch auf Deckgläsern explantiert. In Carrelschalen eingebettete Leberexplantate konnten in demselben Plasma über mehrere Wochen gezüchtet werden, wobei nur das überstehende flüssige Nährmedium erneuert wurde (48-72 Stunden).
Guppygewebeexplantate sind vorwiegend auf Deckgläsern auf

Grund häufiger Umsetzungen (alle 72-48 Stunden) mit starkem Zellwachstum gezüchtet worden.

WOLF et al. (1957) kultivierten erfolgreich mehrere Gewebearten (Milz, Niere, Herz, Schwimmblase, Gonaden, Flossen u.a.) verschiedener Teleosteer (S a l m o g a i r d n e r i Rich., S a l v e l i n u s f o n t i n a l i s Mich., S a l m o t r u t t a L., C a r a s s i u s c a r a s s i u s L.) direkt auf der Glasunterlage der Zuchtgefäße. Die Autoren berichten aber über bessere Zuchtergebnisse, wenn die Explantate in koaguliertem Hühnerplasma eingebettet worden waren. Verschiedene Medien (Medium 199, Earle's-Hanks- und Tyrode's-Salzlösung mit 5 % Embryonalextrakt, 10-20 %-Mammalier- oder Fischserum + Antibiotika 100 I.E. Penicillin, 100 Gamma Streptomycin) erwiesen sich für das Zellwachstum als zufriedenstellend. Ein Mediumwechsel wurde alle 4-7 Tage vorgenommen. Die Kulturen hielten sich bei 19°C mit aktiver Zellvermehrung mehrere Wochen.
Über Zellwachstum von explantiertem Gewebe verschiedener mariner Fische (siehe Tabelle 2) berichteten TOWNSLEY et al. (1963). Die Gewebestücke wurden ohne Stützsubstanz für die auswachsenden Zellen direkt in Plastikflaschen (30 ml) explantiert.

Unter den verwendeten Medien (Eagle's Basalmedium, Eagle's Hela-Medium, Medium CMRL 1066 mit verschiedenen Zusätzen (z.B. Hühnerplasma, Kälberserum, Embryonalextrakte u.a.) erwies sich TC 199 mit 10 % Humanserum und Antibiotika (Penicillin 50 I.E./ml, Streptomycin 50 I.E./ml, Mycostatin 50 I.E./ml) als die beste Nährlösung. Während die bei 5°C inkubierten Explantate eine langandauernde, gute Zellvermehrung zeigten, wuchsen dagegen bei 20°C die Zellen nur in begrenztem Maße aus. Die Kulturen blieben in einigen Fällen mehrere Monate lang in einem guten Zustand.

Tabelle 2

Zellwachstum (+) aus Explantaten mariner Fische mit Medium 199+10 % Humanserum bei 5°C (nach TOWNSLEY et al. 1963).

Fischart	explantiertes Gewebe						
	Flossen	Milz	Herz	Niere	Leber	Gonaden	sonst.Gewebe
Gadus morhua (Kabeljau)	+	+	-	+	+	+	Gehirn
Roccus americanus (Seebarsch)	+	-	-	-	-	-	-
Pseudopleuronectes am. (Flunder)	+	+	+	+	+	-	-
Raja radiata (Sternrochen)	-	+	+	+	-	-	Uterus
Lophius pisc. (Seeteufel)	+	+	+	-	+	-	Gehirn
Pollachius virens (Seelachs)	+	+	+	+	-	+	-
Myoxocephalus scorpius (Seeskorpion)	+	+	+	+	-	+	-

2.2.3. Einschichtzellkulturen

Stationäre Kulturen werden als "Einschichtzellkulturen (monolayer cell cultures)" bezeichnet. Seit der Einführung der Trypsinierungsmethode in die Fischzellkulturtechnik (GRÜTZNER, 1958) besteht die Möglichkeit, relativ große Zellmengen aus frischem Fischgewebe enzymatisch aufzuschließen und auf einer geeigneten Zuchtunterlage zur Vermehrung zu bringen.

2.2.3.1. Primärkulturen

Primärkulturen werden stets aus Zellen frischer Organe und Gewebe hergestellt.

2.2.3.1.1. Aufschluß der Gewebe

In der Fischzellkulturtechnik wurde in Anlehnung an die enzymatischen Zelldissoziierungsmethoden der Warmblütergewebe ein Gewebeaufschluß (Herauslösung der Interzellularsubstanz) mit verschiedenen Enzymen wie Trypsin, Collagenase, Hyaluronidase, Pankrease, Papain, Pronase u.a. versucht.

Wie in der Mammalierzellkulturtechnik hat sich Trypsin in 0,25 %iger Konzentration als Aufschlußmittel für die verschiedensten Fischgewebearten bewährt.
Als wichtiges Kriterium erwies sich die Aufschlußtemperatur. Sie soll nach WOLF und QUIMBY (1969 b) bei Gewebe der meisten Fischarten 25°C nicht übersteigen und nicht unter 4°C liegen. Einige Autoren (GRÜTZNER, 1958; CLEM et al., 1961; u.a.) schlossen das Gewebe von Warmwasserfischen erfolgreich bei Raumtemperatur in 30 bis 150 Minuten auf; andere Autoren (WOLF et al., 1960; JENSEN, 1963; u.a.) benutzten dagegen mit gutem Erfolg die über-Nacht-Trypsinierung bei 4°C zum Gewebeaufschluß sowohl von Kalt- wie aber auch von Warmwasserfischen. Im Gegensatz hierzu berichteten PFITZNER und GRÜTZNER (1964), daß die Kältetrypsinierung bei 4°C über Nacht keine anzüchtbaren Zellen erbrachte. Später gelang es PFITZNER (1968) dennoch, auch die bei 4°C dissoziierten Gonadenzellen

des T i n c a t i n c a (L.) zu kultivieren.

WOLF et al. (1960) ermittelten, daß die Kältetrypsinierung bei 4°C über Nacht sowohl das Gewebe von Warm- und Kaltwasserfischen, wie auch das von Amphibien und Reptilien ohne sichtbare Zellschädigung schonend aufschließt. Die Autoren benutzten hierzu eine modifizierte PBS-Lösung (DULBECCO und VOGT, 1954), bestehend aus 87,5 % PBS, 10 % Trypsinlösung (2,5 %ig), 2,5 % Serum + Antibiotika (Penicillin 200 I.E./ml, Streptomycin 200 Gamma/ml).
Während GRÜTZNER (1958), BABINI und GHITTINO (1961) u.a. die 0,25 %ige Trypsinlösung in PBS mit aqua dest 1:4 verdünnten, schlossen andere Autoren (JENSEN, 1963; ROBERTS, 1964, 1966; LI und STEWART, 1965; GRAVELL und MALSBERGER, 1965) das Gewebe mehrerer Fischarten erfolgreich mit unverdünnten Trypsinlösungen (0,25 %ig) auf.
Heute werden zur Herstellung von Primärkulturen die verschiedenen Gewebe von Süß- und Salzwasserteleosteern mit 0,25 %igem Trypsin in PBS, pH 7,2-7,4, entweder für 30-250 Minuten bei 15-25°C oder über Nacht bei 4°C in Einzelzellen dispergiert.

Der enzymatische (0,25 % Trypsin) Gewebeaufschluß mariner Teleosteer wurde in einer magnesiumfreien und mit 0,07 M NaCl angereicherten trypsinhaltigen Hanks' Salzlösung bei Raumtemperatur eine Stunde lang erfolgreich durchgeführt (CLEM et al., 1961).
ROBERTS (1966) beobachtete beim Aufschluß der Gewebe mariner Fische mit einer Trypsinlösung ohne NaCl-Zusatz vorwiegend vakuolisierte Zellen. Der Autor führte diese Beobachtung auf eine Hypotonie der Aufschlußlösung zurück.

Verschiedenes Gewebe wie Embryonen, Ovidukt, Drüsen, Niere, Milz, Herz u.a. mariner Elasmobranchier wurde mit 0,25 % Pancreatin in einer mit 1,75 - 2,0 g% Harnstoff und 0,5-0,6 g% NaCl angereicherten PBS-Lösung, pH 7,3, mit den brauchbarsten Ergebnissen bei 4°C, fraktioniert (alle 4 Stunden eine Abnahme) aufgeschlossen.

Die dispergierten Ovarien- und Pankreaszellen waren allerdings nicht anzüchtbar (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

2.2.3.1.2. Zelleinsaat und Subkulturen

Die aufgeschlossenen Zellen werden durch Zentrifugation (200 x g für 10 Minuten) sedimentiert. Die schonendste Zentrifugationstemperatur für Fischzellen liegt bei 4-8°C (WOLF und QUIMBY, 1969 b). Nach Zellzählung (in Zählkammern oder mittels elektronischer oder photometrischer Geräte) werden die Zellen im Anzuchtsmedium resuspendiert und auf eine bestimmte Konzentration (Zellen/ml) im Medium eingestellt.
Über optimale Zelleinsaatmengen herrschen unterschiedliche Meinungen. Viele Autoren (WOLF und QUIMBY, 1969 b, u.a.) halten 1-3x10^5Zellen/ml für ausreichend. GRÜTZNER (1958) dagegen hielt die 3-4fache Menge an Zellen für notwendig, um gute Leber- und Nierenkulturen (T i n c a t i n c a L.) zu erhalten. CLEM et al. (1961) berichteten wiederum, daß es erforderlich sei, die Zellen mariner Teleosteer in Konzentrationen von 8-10x10^5Zellen/ml einzusäen. FRYER (1964) und FRYER et al. (1965) geben sogar Zellkonzentrationen von 1-1,5x10^6Zellen/ml für einen Primäransatz an.
Bei optimalen Zuchtbedingungen wachsen die Zellen in 24-96 Stunden nach der Einsaat zu einer dichten Zellschicht aus. Dichte Kulturen werden subkultiviert, indem die enzymatisch oder physikalisch (Abschaben, Abschütteln) von der Zuchtunterlage abgelösten Zellen in neue Gefäße zur weiteren Vermehrung übertragen werden.
Zur Zellablösung wird i.d.R. eine Trypsin-Versen-Lösung (s.Tabelle 3) verwendet. Die Einschichtkulturen werden mit dieser Lösung überschichtet und die Zellen lösen sich nach einer 10-20minutigen Inkubation bei Raumtemperatur von der Zuchtunterlage ab. Nach Zentrifugation (200 x g, 5-10 Minuten) und Aufteilung (1:2 - 1:3 oder mehr) im Anzuchtmedium, kommen die in die Zuchtgefäße wieder eingefüllten Zellen zur weiteren Bebrütung.

Tabelle 3

Versen-Trypsinlösung für die Zellablösung von der Zuchtunterlage (nach WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Zusammensetzung	Menge	
aqua bidest	960	ml
NaCl	8	g
KH_2PO_4	0,20	g
KCL	0,20	g
Na_2HPO_4	1,15	g
Versen (EDTA)	0,20	g
Trypsinlösung 2,5 %ig	40	ml

2.2.3.2. Zell-Linien

Definitionsgemäß stellen permanente Zell-Linien (established cell-lines) Zellpopulationen tierischer und menschlicher Herkunft dar, die durch Subkultivierung über unbegrenzte Zeiten hinweg vermehrt werden können und deren Karyotyp sich von dem der Ursprungszellen unterscheidet. Nach den mit Mammalierzellen gemachten Erfahrungen kann dann eine Zellpopulation als permanente Zell-Linie bezeichnet werden, wenn sie mindestens 70x erfolgreich subkultiviert werden konnte (BACHMANN, 1970). Ob diese Erkenntnis auch auf Fischzellen übertragbar ist, bedarf noch einer Klärung.

Die erste Fischzell-Linie wurde 1960 von WOLF und QUIMBY (1962) aus Gonaden der Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) gezüchtet. In der Folgezeit wurden seitdem 16 weitere Zell-Linien aus Teleosteergewebe etabliert. Es stammen 7 dieser Fischzell-Linien von Salmoniden, 3 von Cypriniden, 6 von Centrarchiden und eine von Pleuronectiden ab (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Fischzell-Linien, aufgeführt nach Herstellungsjahr, Spezies, Gewebe, Zellmorphologie, Medium, Optimaltemperatur und Autoren. (Nach WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Herst.-Jahr	Bezeichnung	Spezies	Gewebe	Zellmorph.	Medium	pH Optimum	Temperaturoptimum °C	Autor	Publik.-Jahr
1963	CSE 119	Oncorhynchus kisutch	Embryo	F	MEM+20%AKS	7,4	21 (4-27)	FRYER et al.	1965
1963	CHSE 114	Oncorhynchus tschawytscha	Embryo	F	MEM+20%AKS	7,4	21 (4-27)	FRYER et al.	1965
1963	STE 137	Salmo gairdneri	Embryo	F	MEM+20%AKS	7,4	21 (4-27)	FRYER et al.	1965
1963	RTH 149	Salmo gairdneri	Hepatom	E	MEM+20%AKS	7,4	21	FRYER et al.	1965
1960	RTF-1	Salmo gairdneri	Embryo	E	MEM+10%FKS	7,4-7,8	n.b. (4-26)	WOLF und QUIMBY	n.b.
1960	RTG-2 (CCL-55)	Salmo gairdneri	Gonaden	F	MEM+10%FKS	7,3-7,6	20 (4-26)	WOLF und QUIMBY	1962
1964	RTO	Salmo gairdneri	Ovar	F	M199+5%FKS	7,2	18 (n.b.)	LI und STEWART	1965
1962	FHM (CCL-42)	Pimephales promelas	Caudad trunk	E	MEM+10%FKS	7,2	34 (0-36)	GRAVELL und MALSBERGER	1965
1967	ZDG-1	Brachydanio rerio	Gonaden	F	MEM+n.b.% FKS(8:2H_2O)	7,0-7,2	n.b. (21-25)	FILAZOLLA et al.	n.b.
962	BB	Ictalurus nebulosus	Trunk	F	MEM+10%FKS	7,4	n.b. (4-34)	CERINI und MALSBERGER	1962
967	SF	Lutjanus griseus	Flossen	F	EAGLES BM+ 10%KS+10%HS	7,0-7,2	n.b. (20-25)	HOROWITZ et al.	n.b.

Herst.-Jahr	Bezeichnung	Spezies	Gewebe	Zellmorph.	Medium	pH Optimum	Temperaturoptimum °C	Autor	Publik.-Jahr
1964	BF-2	Lepomis macrochirus	Caudad trunk	F	MEM+10%FKS	7,4-7,6	n.b. (10-30)	WOLF und QUIMBY	n.b.
1964	BGL	Lepomis macrochirus	Caudad trunk	F	MEM+10%FKS	7,2-7,4	34 (4-35)	GRAVELL und MALSBERGER	1965
1964	LBF-1	Micropterus salmoides	Caudad trunk	F	MEM+10%FKS	7,4	n.b. (15-25)	WOLF und QUIMBY	n.b.
1961	GF-1 (CCL-58)	Haemulon sciurus	Flosser	E	EAGLES BM+ 10%KS+10%HS	7,0-7,2	21 (15-25)	CLEM et al.	1961
1965	GFS	Haemulon flavolineatum	Flossen	E	EAGLES BM+ 10%KS+10%HS	7,0-7,2	n.b. (20-25)	SIGEL et al.	n.b.
1965	ESF-1	Pleuronectes vetulus	Flosser	F	MEM+10%FKS	7,5	20 (10-25)	R.C.COOPER	n.b.

In der Tabelle steht für:

AKS = Agamma-G-Kälberserum
FKS = fötales Kälberserum
KS = Kälberserum
HS = Humanserum
MEM = EAGLES Minimal Essential Medium (EAGLE, 1959)
M 199 = Medium 199 (MORGAN et al., 1950)
EAGLE'S BM = EAGLE'S Basal-Medium (EAGLE, 1955, 1956)
E = epithelähnliche Zellen
F = fibroblastenähnliche Zellen
n.b. = nicht bekannt

Bei den bisher chromosomenanalytisch untersuchten Fisch-Zell-Linien wurden heteroploide Chromosomensätze ermittelt. Diploide Zellen, wie sie bei Mammalierzell-Linien vorkommen können, konnten nur bei einer der Fisch-Zell-Linien, nämlich bei der SeE-Zell-Linie (embryonale Zellen eines Salmoniden), (WINGFIELD, 1968) beobachtet werden. Diese SeE-Zell-Linie blieb für 50 Subkulturen diploid, riß aber dann ab. Es scheint, daß zwischen der unbegrenzten Lebensdauer der i n v i t r o gezüchteten Zellen und den Chromosomenalterationen, ähnlich wie bei Mammalierzellen, Parallelen bestehen.
Die Karyostabilität von i n v i t r o kultivierten Fisch-Zellen wurde bisher noch wenig untersucht; man vermutet aber, daß auch die Fisch-Zell-Linien eine gewisse chromosomale Konstanz aufweisen.

Von den Mammalier-Dauerzell-Linien ist bekannt, daß die Zellen sich allgemein im Stoffwechsel, Morphologie, Wachstumsrate und in der Virusempfindlichkeit meist erheblich von den Zellen der Ausgangskultur unterscheiden (BACHMANN, 1970). Exakte Untersuchungen über die Fischzell-Linien liegen hierüber zur Zeit noch nicht vor.

Subkultiviert werden Zell-Linien wie die Zellen der primären Einschichtgewebekulturen, indem sie mittels einer Trypsin- oder Trypsin-Versenlösung von der Wachstumsunterlage abgelöst und nach Aufteilung (1:5-1:20) wieder neu inkubiert werden. Die Zelleinsaatmenge liegt bei Zell-Linien zwischen $1x10^3$ bis $1x10^5$ Zellen/ml Medium. PLUMP und WOLF (1969) ermittelten für die RTG-2-Zell-Linie eine optimale Zelleinsaatmenge von $5x10^4$ Zellen/ml.
Von den in Tabelle 4 aufgeführten Fischzell-Linien können die RTG-2 (CCL-55)-, die FHM (CCL-42)- und die GF-1 (CCL-58)-Zell-Linie bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockeville Maryland, 20 852, angefordert werden.

2.3. Nährstoffbedürfnisse der i n v i t r o kultivierten Fischzellen

Auf Grund der bei Säugerzellen gemachten Erfahrungen kann angenommen werden, daß auch i n v i t r o kultivierte Fischzellen weitgehend entdifferenzieren. Neben dem Verlust organotypischer Funktionen weisen die Zellen in Kultur veränderte Stoffwechselaktivitäten auf.

Durch die aktive Zellvermehrung i n v i t r o nimmt der Eiweiß- und Nucleinsäurestoffwechsel stark zu. In vollem Maße ist die Fähigkeit vorhanden, aus den über das Nährmedium zugeführten Bausteinen Eiweiße und Nucleinsäuren zu synthetisieren. Die meisten Zellkulturen animaler Herkunft stimmen im allgemeinen in ihren Nährbedürfnissen weitgehend überein, wodurch sich für die Praxis bei der Medienherstellung Vereinfachungen ergeben.

In den gebräuchlichen Nährmedien sind anorganische Ionen (Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Cl^-, $H_2PO_4^-$, HCO_3^-); Vitamine (Cholin, Folsäure, Inosit, Nicotinamid, Pantothensäure, Pyridoxal, Riboflavin, Thiamin); L-Aminosäuren (Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Valin, Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin, Tyrosin) und Kohlenhydrate (meist Glucose) enthalten. Der weitere Bedarf an Spurenelementen und zusätzlichen Wuchsstoffen wird durch Blutserumzugaben gedeckt.

2.3.1. Salzlösungen

Die Salzlösungen sind für i n v i t r o kultivierte Zellen unerläßliche Energie- und Ionenlieferanten, gewährleisten weitgehend stabile pH-Bedingungen und schaffen die jeweils angemessenen osmolaren Verhältnisse.

Die Zusammensetzung der anorganischen Komponenten der Salzlösungen basiert vorwiegend auf Analysen von Meerwasser und Blutserum höherer und niederer Vertebraten.

Heute werden auf Grund der ähnlichen Ionenverhältnisse im Blutserum vieler Vertebraten (z.B. Forelle und Mensch) die in der Mammaliergewebekultur üblichen Salzlösungen für die Fischzellzucht erfolgreich angewendet.

2.3.1.1. Süßwasserteleostei

Hauptsächlich werden die Salzlösungen nach EARLE (1934), nach HANKS (1948) und nach DULBECCO und VOGT (1954) für Zellkulturen aus Süßwasserteleosteergewebe verwendet. Das Blut der Süßwasserteleosteer weist eine durchschnittliche Gefrierpunktserniedrigung von -0,57°C (BLACK, 1957) bzw. -0,54°C (LOCKWOOD, 1961) gegenüber -0,58° - 0,60°C bei Warmblütern auf. Zunächst schien es daher notwendig, um optimal osmolare Verhältnisse zu schaffen, die Mammaliersalzlösungen mit einer Gefrierpunktserniedrigung von etwa -0,60°C isotonisch (1:4 - 1:5) mit aqua dest. zu verdünnen (GRÜTZNER, 1956 a, 1958; BABINI und GHITTINO, 1961; KUNST, 1962; PFITZNER und GRÜTZNER, 1964; TOMASEC et al., 1964; RACHLIN et al., 1967).

Obwohl vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der i n v i t r o kultivierten Fischzellen unter verschiedenen osmolaren Bedingungen nicht vorlagen, wurden die Mammaliersalzlösungen in der Folgezeit unverdünnt ohne sichtbare Zellschädigungen angewandt (WOLF et al., 1960; WOLF und QUIMBY, 1962; PFITZNER, 1965; LI und STEWART, 1965; KUNST und FIJAN, 1966; u.a.). Die meisten Süßwasserteleosteerzell- und Gewebekulturen, einschließlich der permanenten Zell-Linien, werden heute in Salzlösungen und Medien mit einer Gefrierpunktserniedrigung von etwa -0,60°C gezüchtet (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

2.3.1.2. Marine Teleostei

Obwohl die Teleosteer im Süß- und Meerwasser auf Grund ihrer osmoregulatorischen Fähigkeit trotz der hohen Salzunterschiede dieser beiden Medien nur wenig verschiedene osmotische Konzentrationen ihrer Körperflüssigkeiten (siehe Tabelle 5) aufweisen, scheint es notwendig, in den Kulturmedien mariner Teleosteer die Salzkonzentration zu erhöhen. CLEM et al. (1961) konnten mit einem Zusatz von 0,07 M NaCl zur HANKS-Salzlösung wesentlich bessere Kultivierungserfolge bei Zellen mariner Teleosteer erzielen als mit der unmodifizierten HANKS-Lösung. WOLF und QUIMBY (1969 b) verwendeten erfolgreich mit 0,3 g% NaCl angereicherte Mammalier-Salzlösungen. Nach CLEM et al.

(1961) ist es erforderlich, die NaCl-Konzentration der Salzlösung für Meerwasserteleosteergewebe auf 0,206 M = 12 g NaCl/l (gegenüber 0,137 M = 7,6 g NaCl/l) bei Verwendung von Warmblüterkulturmedien zu erhöhen.

Tabelle 5

Gefrierpunktserniedrigung des Blutes und des Außenmediums verschiedener Kaltblüter (nach SCHLIEPER, 1965).

	Δ °C Blut	Δ °C Außenmedium
Frosch (Rana esculenta)	0,40	
Karpfen (Cyprinus carpio)	0,50	0,02 Süßwasser
Scholle (Pleuronectes platessa)	0,79	1,90 Nordsee
Hai (Scyllium caniculum)	2,22	2,15 Mittelmeer
Aal (Anguilla anguilla)	0,62	0,02 Süßwasser
Aal (Anguilla anguilla)	0,69	2,15 Mittelmeer

2.3.1.3. Marine Elasmobranchii

Die marinen Elasmobranchier weisen als poikilosmotische Tiere, d.h. ohne nennenswerte osmoregulatorische Fähigkeiten, in den Körperflüssigkeiten eine dem umgebenden Meerwasser analoge Isotonie auf. Diese Isotonie kommt aber nicht durch eine dem Meerwasser entsprechende Salzkonzentration des Innenmediums zustande, sondern sie wird durch den 2-3 %igen Harnstoffgehalt des Blutes bewirkt (SCHLIEPER, 1965).
Der Zusatz von 2-3 g% Harnstoff und die Erhöhung der NaCl-Konzentration der Salzlösung schien für das Überleben der Gewebe mariner Elasmobranchier unentbehrlich (LEWIS, 1916; LOCKWOOD, 1961).
WOLF und QUIMBY (1969 a) stellten in empirischen Untersuchungen fest, daß eine modifizierte HANKS-Salzlösung, angereichert mit 1.75 - 2.0 g% Harnstoff und 0.5-0.6 g% NaCl (Gefrierpunktserniedrigung -1.50°C), für das Gewebe mehrerer untersuchter Selachier (Haie) geeignet ist.

2.3.1.4. Cyclostomata

Nach URIST und VAN de PUTTE (1967) sind die Konzentrationen der anorganischen Bestandteile im Blut der Cyclostomata im Süßwasser annähernd gleich denen der Süßwasserteleosteer. Marine Cyclostomata weisen dagegen im Serum eine den marinen Teleosteern entsprechende höhere NaCl-Konzentration auf. WOLF und QUIMBY (1969 a) berichteten, daß für das larvale Gewebe von Süßwassercyclostomata unmodifizierte HANKS-Lösung geeignet sei.

2.3.2. Fischzellkulturmedien und deren Zusätze

2.3.2.1. Zellkulturmedien

Exakte Untersuchungen über Nährstoffbedürfnisse und Stoffwechselanforderungen der i n v i t r o gezüchteten Fischzellen liegen noch nicht vor. Die Erfahrungen zeigen aber, daß hier ähnliche Ernährungsverhältnisse wie bei den Mammalierzellen vorliegen müssen. Aus diesem Grunde werden heute

für die Züchtung von Fischzellen Mammalierzellkulturmedien mit entsprechenden Zusätzen (vorallem Blutserum) verwendet. Hauptsächlich sind dies EARLE'S- (1934) und HANKS' (1948)-Salzlösungen als Mediumgrundlage oder die Medien TC 199 (MORGAN et al., 1950), EAGLES Basal-Medium (EAGLE, 1955; EAGLE et al., 1956), EAGLES Minimal Essential Medium (=MEM), EAGLE, 1959) und das L_{15}-Medium (LEIBOVITZ, 1963).
SORET und SANDERS (1954) berichten erstmals über die erfolgreiche Verwendung eines halbsynthetischen Mammaliermediums (dem Medium 199) in der Fischzellkultur.
WOLF und DUNBAR (1957, 1958) verwendeten ebenfalls erfolgreich das Medium 199, angereichert mit Vertebratenseren und Embryonalextrakt. GRÜTZNER (1958) züchtete mit isotonisch verdünntem Medium 199 (+ 15-30 % Kälberserum als einzigen Zusatz) trypsiniertes Leber- und Nierengewebe von T i n c a t i n c a (L.). Für Zellkulturen aus Süßwasserfischgeweben werden wegen der nur geringen osmolaren Unterschiede die genannten Mammalierzellkulturmedien heute unverändert verwendet. Ebenso scheinen die Zellen aus Cyclostomiergewebe in diesen unmodifizierten Medien zu wachsen. Bei der Zellzüchtung mariner Teleosteer bzw. Elasmobranchier müssen dagegen die aufgeführten Nährlösungen mit 0,5-0,6 g% NaCl und 1,75 - 2,0 g% Harnstoff angereichert werden, um den osmotischen Anforderungen dieser Zellen zu entsprechen.

2.3.2.2. Medienzusätze

Von den Vertebratenseren (Fisch, Pferd, Kälber, Kaninchen, Schaf, Schwein, Mensch) als Mediumzusatz haben sich besonders Humanserum mit ausgezeichnetem, Pferde-, Kälber- und Schafserum mit gut bis mäßig beschriebenem wachstumsstimulierenden Effekt bewährt. Homologes wie heterologes Fischserum ergab unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Zellwachstums. Einige Autoren beobachteten mit Fischseren eine gute Wachstumsstimulierung (BABINI und GHITTINO, 1961; KUNST, 1961, 1962; TOMASEC et al., 1964; u.a.) Andere dagegen stellten wachstumsinhibierende (CLEM et al., 1961) oder toxische Eigenschaften fest (FRYER, 1964; FRYER et al., 1965).

Nach WOLF und QUIMBY (1969 b) besteht bei der Verwendung von Fischserum außerdem die Gefahr der Einschleppung latent vorhandener Fischviren.

Kälberserum scheint wegen des guten wachstumsstimulierenden Effektes, der leichten Gewinnung sowie der relativ geringen Kosten das Serum der Wahl für die Fischzellkultur zu sein. Wenn die Kostenfrage keine wesentliche Rolle spielt, ist fötales Kälberserum vorzuziehen, da durch dieses Serum die Zellen oftmals zu einer größeren Vermehrungsfähigkeit angeregt werden.

Das Serum wird meist in 10-15 %iger Konzentration dem Medium zugesetzt; in einigen wenigen Fällen scheinen Zusätze von 20-30 % für ein ausreichendes Zellwachstum notwendig zu sein.

Humane Aszitesflüssigkeit als Mediumzusatz wurde von verschiedenen Autoren mit sehr gutem Erfolg verwendet.

GREENBERG et al. (1956) erzielten mit 55 % humaner Aszitesflüssigkeit in Hühnerplasma und Embryonalextrakt bessere Züchtungsergebnisse als mit gleichen Konzentrationen von Karpfenserum.

TOWNSLEY et al. (1963) verglichen die Brauchbarkeit von Aszitesflüssigkeit und Humanserum in 10 %iger Konzentration mit Medium 199 und berichteten über sehr gute Zuchterfolge in beiden Fällen. LI und STEWART (1965) benutzten mit ausgezeichnetem wachstumsstimulierenden Effekt Aszitesflüssigkeit mit 15 % Serum und 5 % Embryonalextrakt im Medium 199.

Nach WOLF und QUIMBY (1969 b) besteht kein Zweifel, daß humane Aszitesflüssigkeit ein guter Wachstumsstimulus für die i n v i t r o kultivierten Fischzellen darstellt.

Embryonalextrakte von Fischen, Hühnern, Kälbern wurden zwar mit gutem Erfolg in der Fischzellkultur eingesetzt, doch scheinen gleiche Mengen eines vorgetesteten Kälberserums ähnliche wachstumsfördernde Effekte zu bewirken (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Ei-Ultrafiltrate und Agamma-Kälberserum sind bisher in geringem Ausmaß in der Fischzellzucht verwendet worden. WOLF und QUIMBY (1969 b) berichten, daß durch eine 5 %ige Zugabe von Eiultrafiltrat im Medium bei mehreren Fischzell-Linien ein Abgleiten in die regressive Phase verhindert werden konnte. Mit Agamma-Kälberserum wurden einige Fischzell-Linien (CSE 119, CHSE 114, STE 137, RTH 149) erfolgreich gezüchtet.

Die Anwendung von Rinderamnionflüssigkeit (RAF) scheint in der Fischzellkultur wenig Fürsprecher gefunden zu haben. WOLF und DUNBAR, (1957); JENSEN, (1963), TOWNSLEY et al., (1963) berichten, daß 5-20 % RAF im Medium keine sichtbare Wirkung auf das Zellwachstum hatte. GRÜTZNER (1958) dagegen beobachtete Zellwachstum von trypsiniertem Leber- und Nierengewebe (T i n c a t i n c a) in einem Medium, bestehend aus 70 % RAF + Laktalbumin und Hefeextrakt (isotonisch verdünnt) + 30 % Kälberserum. KUNST (1962) untersuchte mehrere Medien und fand, daß Karpfennierenzellen optimal mit 74 % RAF und 24 % Kälberserum - beide Bestandteile isotonisch verdünnt - wuchsen. In unverdünntem Medium zeigte sich dagegen kein Zellwachstum.

Laktalbuminhydrolysat (LA), Pepton und Hefeextrakt haben in der Fischzellkultur nur begrenzt Eingang gefunden und werden als obsolet bezeichnet (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß die meisten Autoren mit Blutserum (Mensch, Kalb) als biologischem Mediumzusatz die besten Züchtungserfolge verzeichnen konnten (GRÜTZNER, 1958; PFITZNER und GRÜTZNER, 1964; FRYER, 1964; LI und STEWART, 1964; FRYER et al., 1965; WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Antibiotika werden in der Fischzellkultur in ähnlicher Konzentration wie bei den Mammalierzellkulturen den Medien und Lösungen zugesetzt. Zelltoxizitäts- und Wachstumsinhibitionsversuche durch verschiedene hohe Antibiotikakonzentrationen im Medium liegen hierzu aber noch nicht vor.

Routinemäßig kommen Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 100 Gamma/ml, Nystatin 25 I.E./ml in Anwendung. WOLF und QUIMBY (1969 b) benutzten gelegentlich auch Tetracyclin-HCl (50 Gamma/ml) anstatt Penicillin und Streptomycin. Kanamycin (25-50 Gamma/ml) kann erforderlich werden, wenn resistente Keime auftreten.

2.4. Biologie der Fischzellen i n v i t r o

2.4.1. Morphologie und Vermehrung

I n v i t r o kultivierte Zellen weisen gegenüber den Ursprungszellen im Gewebeverband eine veränderte Morphologie und ein verändertes Verhalten gegenüber Umwelteinflüssen auf.

Die Zellmorphologie i n v i t r o hängt prinzipiell davon ab, ob die Zellen in Suspension (überwiegend Rundzellen) oder als stationäre Einschichtkulturen (Fibroblasten-, Epithel- oder polymorphe Zellen) gezüchtet werden.
Nach BACHMANN (1970) sind die morphologischen Merkmale zur Unterscheidung von Zellen i n v i t r o nur von relativem Wert, da die Form und Gestalt stark von den Umweltbedingungen abhängt. Bei den stationär gezüchteten Fischzellen werden hauptsächlich zwei morphologische Hauptformen unterschieden:

Fibroblastenähnliche Zellen, sie entstammen meistens mesodermalen Geweben und Tumoren;
Polygonale (epitheloide) Zellen, sie stammen von Epithelien und Tumoren ab.
Zellen beider Wuchstypen (Mischkultur) werden hauptsächlich in Primärkulturen beobachtet.

GRÜTZNER (1956 a) schilderte morphologische Beobachtungen an embryonalen Guppiegewebekulturen, wobei Fibroblasten, amöboid bewegliche Rundzellen (Makrophagen, Blutzellen) Melanophoren und Epithelzellen in den Kulturen festgestellt wurden. Mit zunehmender Kultivierungsdauer überwogen schließlich fibroblastenähnliche Zellen. Trypsinierte Leberzellen von

T i n c a t i n c a (L.) wuchsen hauptsächlich spindelförmig, Nierenzellen dagegen fibroblasten- und epithelähnlich (GRÜTZNER, 1958). Nach PFITZNER (1965), PFITZNER und FROEHLICH (1966), u.a. wachsen trypsinierte Schwimmblasenzellen von Süßwasserteleosteern fibroblastoid, Gonadenzellen dagegen entweder mit einer gemischten oder ebenfalls mit einer fibroblastoiden Morphologie. Temperaturen (PFITZNER und GRÜTZNER, 1964) und verschiedene pH-Werte der Medien (LI und JORDAN, 1969) scheinen die Zellmorphologie i n v i t r o weitgehend mit Übergängen von einem Wuchstyp zum anderen (bis zur Degeneration) zu verändern. Bei primären Einschichtzellkulturen treten innerhalb der Zellpopulation meist immer sehr heterogene Zelltypen auf, bei denen aber mit steigender Subkultivierung ein Zelltyp (meist fibroblastoide Zellen) mehr und mehr überwiegt.

Von den existierenden Fischzell-Linien haben 12 einen reinen fibroblastoiden und 5 einen epitheloiden Wuchstyp.

Der Vermehrungszyklus animaler Zellen i n v i t r o weist allgemein folgende Kinetik auf:

Nach einer Ruhepause (Zellhaftung und Adaptierung an das Medium) beginnt die Zellvermehrung. Die Zellen verdoppeln sich allgemein unter optimalen Zuchtbedingungen in 2-4 Tagen (RTG-2-Zell-Linie in 2 Tagen). An diese logarithmische Phase schließt sich die stationäre Phase an, wobei die Vermehrung mit dem Dichtwachsen der Kultur aufhört. RTG-2-Zellen konnten bei 4°C inkubiert, über zwei Jahre in der stationären Phase gehalten werden (PLUMB und WOLF, 1971). Wenn in der Regel bei den sich in der stationären Phase befindlichen, unter Anzuchtsbedingungen gehaltenen, dichten Kulturen nach etwa 10-30 Tagen keine Subkultur erfolgt, so treten die Zellen in die Regressionsphase ein. Die Degeneration beginnt meist damit, daß die Zellen eine fibroblastenähnliche Morphologie annehmen und sich allmählich einzeln oder in Schichten von der Zuchtunterlage ablösen.

2.4.2. Temperaturansprüche

Zur Erzielung optimaler Wachstumsraten kultivierter Fischzellen ist die Einhaltung bestimmter Inkubationstemperaturen erforderlich. Hinsichtlich der Optimaltemperaturen für Zellkulturen der verschiedenen Fischarten existieren unterschiedliche Auffassungen.

Erfahrungsgemäß hat jede Fischart i n v i v o eine Vorzugstemperatur. Je nach Biotop kann eine Gewöhnung eintreten, womit sich infolge einer Adaptation die Temperaturbereiche verschieben können (REICHENBACH-KLINKE, 1970). Günstige Temperaturen für die i n v i t r o Züchtung von Fischzellen scheinen vorzuliegen, wenn man sich nach der Körpertemperatur des Zellspenders bzw. nach Temperatur des ihm eigenen Biotops richtet. Je nach Fischart können die Zellzuchttemperaturen zwischen 5 und 34°C liegen.
Zellkulturen aus Salmonidengewebe scheinen gut bei Temperaturen von etwa 18-23°C zu wachsen. Gonadenzellen der Regenbogenforellen aggregieren teilweise bei Inkubationstemperaturen unterhalb von 8°C und weisen eine stark verminderte Zellproliferation auf. Temperaturen über 28°C dagegen bewirken Zellabkugelungen und Zelltod (LI und JORDAN, 1969).
PLUMP und WOLF (1971) berichteten, daß RTG-2-Zellen (Regenbogenforellengonaden) bei Temperaturen von 5°C bis 20°C mit einem entsprechenden Anstieg der Vermehrungsrate (Zellgenerationszyklus bei 5°C etwa 14 Tage, bei 20°C 2 Tage) wachsen. Bei 25°C war eine geringere Wachstumsrate als bei 20°C, aber eine größere als bei 15°C zu verzeichnen; 30°C überlebten die Zellen nur für kurze Zeit. Das Temperaturoptimum liegt für die RTG-2-Zellen bei etwa 20°C.
Zellen von Cypriniden (z.B. Karpfen) und Warmwasserfischen (Cyprinodontidae z.B. Guppy) beanspruchen entsprechend ihrem, gegenüber den Forellen (10-16°C) höheren Vorzugstemperaturen (12,5-28°C) i n v i v o , auch i n v i t r o höhere Wachstumstemperaturen (22-35°C).

KUNST (1962) züchtete trypsinierte Zellen von Karpfennieren bei 23°C. PFITZNER und FRÖHLICH (1966) berichten dagegen über eine Optimaltemperatur für Ovarienzellen des Karpfens (C y p r i n u s c a r p i o L.) bei 27°C, während die gleiche Zellart des T i n c a t i n c a (L.) (Schleie) und des C a r a s s i u s c a r a s s i u s a u r a t u s (L.) (Goldfisch) bei 22°C sich erfolgreich vermehrten. Nach GRÜTZNER (1958) wiederum lassen sich bei 26°C Leber- und Nierengewebe der Schleie gut anzüchten. Embryonales Guppygewebe vermehrte sich gut bei 26-28°C, war aber bei 35°C nur wenige Tage vermehrungsfähig (GRÜTZNER, 1956 a).

PFITZNER (1965) nennt für diese Zellart eine Optimaltemperatur von 26°C. Für die FHM-Zell-Linie (Cyprinidengewebe) wird eine Optimaltemperatur von 34°C angegeben (GRAVELL und MALSBERGER, 1965).
Nach TOWNSLEY et al. (1963) kann die Körpertemperatur mariner Kaltwasserfische zwischen 3-15°C je nach Jahreszeiten schwanken. Der Autor berichtet über eine gute Zellvermehrung bei 5°C, begrenztes Zellwachstum bei 20°C und kein Wachstum bei 37°C.

2.4.3. pH-Anforderungen

Die Wasserstoffionenkonzentration des Biotopes kann den Lebensrhythmus der Fische entscheidend beeinflussen. Der durchschnittliche Bereich von pH 5-9,5 wird als die Spanne angesehen, innerhalb der die Fische ohne Schaden existieren können (REICHENBACH-KLINKE, 1970). Die Toleranzgrenze der i n v i t r o kultivierten Fischzellen scheint dagegen enger bemessen zu sein. Die Werte im Medium sollen möglichst immer in einem Bereich zwischen pH 7,1 und 7,9 liegen. (LI und JORDAN, 1969). Am Beispiel von Gonadenzellen der Regenbogenforelle beobachteten die Autoren, daß die Zellen bei pH 7,0 granuliert, vakuolisiert waren und ärmlich wuchsen. Bei pH 7,1 - 7,9 war dagegen eine gute Zellvermehrungsrate zu verzeichnen; die Zellen wuchsen spindelförmig oder epitheloid. Bei pH 8,3 traten wiederum Zellgranulierungen und Vakuolisierungen auf.

Nach WOLF und QUIMBY (1969 b) wachsen die Fischzellen gut bei pH-Werten von 7,2 - 7,8. Aber auch bei Extremwerten von pH 8 (mit langdauernder Latenzphase) und pH 6,8 und darunter (ältere Kulturen) wurden keine übermäßigen Zellschädigungen beobachtet. Primärzellen und weniger dichte Kulturen lassen sich bei pH 7,3 - 7,4 besser als bei anderen Werten züchten. Initialalkalisierungen des Mediums nach der Zelleinsaat können durch CO_2-Begasung eliminiert werden.

2.5. Zellkulturlagerung bei niederen Temperaturen und Tiefgefrierkonservierung von Zellen

2.5.1. Zellkulturlagerung bei niederen Temperaturen

Die meisten Fischzellkulturen lassen sich bei niederen, d.h. unterhalb der Zuchttemperatur liegenden Temperatur, für längere Zeiten ohne Mediumwechsel schadlos aufbewahren. Die Zellen verbleiben in einer Art Ruhestadium und weisen veränderte Stoffwechselaktivitäten auf; z.B. Verminderung der Proteinsynthese und des Glukoseverbrauches (WOLF und QUIMBY, 1962).

WOLF und QUIMBY (1967) berichteten, daß bei 12-15°C inkubierte RTG-2-Zellkulturen lediglich 3-4xjährlich subkultiviert werden mußten.

Zellen von Kaltwasserfischen können für Lagerungszwecke stets bei 4°C inkubiert werden. WOLF und QUIMBY (1969 b) konnten Zellen der RTG-2-Zell-Linie mit einer Zelleinsaatdichte von $1,5 - 2,5 \times 10^4$ Zellen/ml zwei Jahre lang ohne Mediumwechsel bei 4°C lebensfähig halten. Weitere Untersuchungen über das Verhalten von Zellen anderer Fischarten bei niederen Inkubationstemperaturen scheinen zur Zeit nicht vorzuliegen.

2.5.2. Tiefgefrierkonservierung von Zellen

Langdauernde Konservierung von lebensfähigen Zellen kann durch Tiefgefrieren mit Konservierungsmitteln (Vitrifikationsflüssigkeiten) vorgenommen werden. Hierbei wird den Zellsuspensionen entweder Glycerin (SCHERER, 1960 u.a.) oder Dimethylsulfoxid

(DMSO), (ASHWOOD-SMITH, 1961; PORTERFIELD und ASHWOOD-SMITH, 1962; DOUGHERTY, 1962) zur Vermeidung von Zellschädigungen während des Einfrierens in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Vitrifikationsflüssigkeiten penetrieren (DMSO schneller als Glycerin) in das Zellinnere, binden das zelluläre Wasser und verhindern somit Zellschädigungen infolge Dehydrierung sowie Veränderungen des Elektrolythaushaltes durch die Kristallisationsvorgänge beim Einfrieren (MERYMAN, 1957, 1960, 1962). DMSO scheint dem Glycerin überlegen (PORTERFIELD und ASHWOOD-SMITH, 1962), da mit DMSO eingefrorene Warmblüterzellen nach dem Auftauen schneller wieder auswuchsen als die mit Glycerin behandelten Zellen.

Generell werden die Zellen (2-6x10^6Z/ml) in einem auf 4°C vorgekühltem Medium mit 10 % oder mehr Serum und 5-10 % Glycerin oder DMSO suspendiert und in Ampullen (1-2 ml) eingefüllt. Um ein rasches Eindringen des Konservierungsmittels in die Zellen zu gewährleisten, sollen diese vor dem Einfrieren 1-4 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden. Anschließend erfolgt langsames Einfrieren (1°C/Min.) bis etwa -25°C und danach werden die Zellen bei -65°C (oder bei tieferen Temperaturen) gelagert.
Das Auftauen der Fischzellen wird in einem Wasserbad (nicht über 20°C) in weniger als einer Minute vorgenommen. Nach Verdünnung mit Anzuchtmedium auf das 6-8fache Volumen kommen die Zellen wieder zur Einsaat. Die meisten der überlebenden Zellen setzen sich innerhalb einer Stunde an der Zuchtunterlage wieder fest. Um das Konservierungsmittel zu entfernen, empfiehlt es sich, nach der Zellhaftung einen Mediumwechsel vorzunehmen. Nach WOLF und QUIMBY (1969 b) werden die Zellen nachstehend aufgeführter Zell-Linien in folgenden DMSO-haltigen Medien eingefroren:

FHM (CCL 42):	EAGLE'S-MEM (HANKS)	85 %
	Kälberserum	10 %
	DMSO	5 %
RTG-2 (CCL 55):	EAGLE'S Basal-Medium	80 %
	Fötales Kälberserum	15 %
	DMSO	5 %

GF (CCL 58):	EAGLE'S Basal-Medium mit nicht essentiellen Aminosäuren	
	(HANKS' mit 0,196 M NaCl)	75 %
	Kälberserum	10 %
	Humanserum	10 %
	DMSO	5 %

Die Überlebensrate tiefgefrorener und wieder aufgetauter Mammalierzellen liegt nach langsamem Einfrieren etwa bei 90-100 %, nach schnellerem Einfrieren etwa um 10-20 % darunter (BACHMANN, 1970).

Die Wiederanzüchtbarkeit von tiefgefrorenen Fischzellen wird in der Literatur als gut, aber ohne nähere Angaben über deren Überlebenschancen beschrieben.

B EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Herstellung von primären Einschichtzellkulturen

1.1.1. Organ- und Gewebeauswahl

Als Materialspender wurden Fische der Arten ausgewählt, die ganzjährig in frischem Zustand und in ausreichenden Mengen beschafft werden konnten.

1.1.1.1. Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.)

Von Fingerlingen, Speise- und Laichforellen sind sowohl die inneren Organe wie Ovarien, Hoden, Herz, Niere, Milz, Leber, Schwimmblase, Gehirn, als auch Flossen-, Kiemen-, Muskel- und Hautgewebe für einen Kulturansatz verwendet worden. Außerdem wurden Zellkulturen aus ca. 18 Tage alten Eiembryonen hergestellt.

1.1.1.2. Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.)

Von den Karpfen verschiedener Altersstufen (KV, K_{1-2}, K_3) ist für die i n v i t r o - Kultivierung das Gewebe von Ovarien, Hoden, Herz, Niere, Milz, Leber, Schwimmblase, Gehirn, Flossen, Kiemen, Muskeln und Haut herangezogen worden.

1.1.2. Salzlösungen und Zellkulturmedien

Die verwendeten Salzlösungen, Zellkulturmedien und die Zusätze wurden in ihrer Osmolarität nicht verändert.
PBS (=Phosphate Buffered Saline) nach DULBECCO und VOGT (1954) ist als physiologische Lösung in folgender Zusammensetzung angewandt worden:

aqua dest.	1000 ml
NaCl	8000 mg
KCl	200 mg
$Na_2HPO_4 x 2H_2O$	1150 mg
KH_2PO_4	200 mg
$CaCl_2$	100 mg
$MgCl_2 x 6H_2O$	100 mg

Der gebrauchsfertigen Lösung wurden 100 I.E. Penicillin und 100 Gamma Streptomycin pro ml Lösung zugegeben.

Als Zellkulturmedien kamen die frisch hergestellten und mit Zusätzen angereicherten Salzlösungen nach HANKS (1948) und EARLE (1934) (s.Tabelle 6) sowie die im Handel erhältlichen Fertigmedien TC 199 (MORGAN et al., 1950) und L_{15} (LEIBOVITZ, 1963) in Anwendung.

Tabelle 6

Zusammensetzung der Salzlösungen nach HANKS (1948) und EARLE (1934).

Bestandteile	Hanks-Lösung	Earle-Lösung
NaCl	8000 mg	6800 mg
KCl	400 mg	400 mg
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	100 mg	200 mg
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	100 mg	-
$CaCl_2$	140 mg	200 mg
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	60 mg	-
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	-	125 mg
KH_2PO_4	60 mg	-
$NaHCO_3$	350 mg	2200 mg
Glucose	1000 mg	1000 mg
aqua bidest.	1000 ml	1000 ml

Die einzelnen Zellkulturmedien wurden mit folgenden chemischen Substanzen, biologischen Stoffen und Antibiotika angereichert:

Chemische Substanzen

Phenolrot

Von einer 0,1 %igen Phenolrotlösung kamen jeweils als pH-Indikator 10 ml zu 1 l Medium hinzu.

Minimal Essential Medium(=MEM) nach EAGLE (1959)

Von den in 100facher Konzentration hergestellten und bei -20° aufbewahrten Stammlösungen (Lösung 1,2,3,4) wurden jeweils 10 ml ad 1000 ml Medium hinzugefügt:

Stammlösung 1	mg/1000 ml aqua bidest.
L-Arginin HCL	10 500
L-Histidin HCL	3 100
L-Isoleucin	5 200
L-Leucin	5 200
L-Lysin HCL	5 800
L-Methionin	1 500
L-Phenylalanin	3 200
L-Threonin	4 800
L-Tryptophan	1 000
L-Valin	4 600

Stammlösung 2	
L-Cystin	2 400
L-Tyrosin	3 600

Stammlösung 3	
L-Glutamin	29 200

Stammlösung 4	
Cholinchlorid	100
Folsäure	100
Pantothensäure	100
Pyridoxal-HCl	100
Thiamin-HCl	100
Riboflavin	10
Isoinositol	200
Nicotinamid	100

Nicht essentielle Aminosäuren (=NEA)

10 ml des nachstehend aufgeführten Aminosäurenkonzentrates (100fach konzentriert, bei -20°C aufbewahrt) wurden zu 1000 ml Medium zugesetzt:

	mg/1000 ml aqua bidest.
L-Alanin	890
L-Asparagin x H_2O	1500
L-Asparaginsäure	1330
L-Glutaminsäure	1470
L-Prolin	1150
L-Serin	1050
Glycin	750

Biologische Zusätze

Kälberserum wurde aus dem im Schlachthof gesammelten Blut frisch getöteter Jungtiere (KS) und Föten (FKS) gewonnen. In Vorversuchen konnten qualitativ schlechte bzw. toxische Serumchargen ermittelt und aussortiert werden.
Zu den Medien kam schließlich das sterilfiltrierte Serum in Konzentrationen von 3 % (Erhaltungsmedium) bis 20 % (Anzuchtsmedium) hinzu.
Ebenso wurde steriles Fischserum aus Karpfen- und Forellenblut in 10-20 %igen Konzentrationen dem Medium hinzugefügt.

Laktalbuminhydrolysat (LA)

Aus dem im Handel erhältlichen Laktalbumin (Difco) ist zunächst eine sterile 5 %ige Lösung hergestellt worden; die Endkonzentration im Medium betrug 0,5 %.

Eiultrafiltrat

Eiultrafiltrat (Difco) kam in 5-10 %iger Konzentration zu den Medien hinzu.

Antibiotika

Den Kulturmedien wurden stets folgende Antibiotika zugesetzt:

Penicillin	100 I.E.	pro ml
Streptomycin	100 Gamma	pro ml
Polymyxin	50 Gamma	pro ml
Neomycin	50 Gamma	pro ml
Mycostatin (Nistatin)	50 I.E.	pro ml

Die kompletten Anzuchtsmedien erhielten in nachstehend aufgeführter Zusammensetzung folgende Bezeichnungen:

Bezeichnung des Mediums	Zusammensetzung
Earle	Earle's Salzlösung mit 10 % Kälberserum 10 % des 5 %igen Laktalbuminhydrolysates 1 % Phenolrot (0,1 %ig) Antibiotikazusatz
EMEM	Earle's Salzlösung mit 10 % Kälberserum 10 % des 5 %igen Laktalbuminhydrolysates 4 % des EAGLE's MEM-Konzentrates 1 % Phenolrot (0,1 %ig) Antibiotikazusatz
HMEM	Hanks' Salzlösung mit 10 % Kälberserum 10 % des 5 %igen Laktalbuminhydrolysates 4 % des EAGLE's MEM-Konzentrates 1 % Phenolrot (0,1 %ig) Antibiotikazusatz
HMEM + NEA	Hanks' Salzlösung mit 10 % Kälberserum 10 % des 5 %igen Laktalbuminhydrolysates 4 % des EAGLE's MEM-Konzentrates 1 % NEA-Konzentrat (=nicht essentielle Aminosäuren) 1 % Phenolrot (0,1 %ig) Antibiotikazusatz
TC 199	Medium 199 mit 20 % Kälberserum Antibiotikazusatz
L_{15}	Medium L_{15} mit 10 % Kälberserum Antibiotikazusatz

Zur Erhaltung dichtgewachsener Kulturen wurde in den aufgeführten Medien der Serumanteil auf 3 % reduziert (Erhaltungsmedium).

1.[illegible] Präparation der Gewebe

Die Präparation der Organe und Gewebe wurde [illegible] Bedingungen im Zellzuchtlaboratorium vorgenommen. Im allgemeinen ist das Anzuchtmaterial [illegible] sofort zu Kulturen verarbeitet worden. Um [illegible] ermitteln [illegible] welchem Lagerungszeitpunkt noch befriedigende Anzuchtergebnisse erzielt werden können, wurden außerdem von den [illegible] Schwimmblase und Gonaden der post mortem über verschiedene Zeiten (12-24-48-72-96 Stunden) bei [illegible] gelagerten Forellen und Karpfen, Zellkulturen hergestellt.

Zu der Entnahme des Anzuchtsmaterials ist nach der Oberflächen-[illegible]ation mit 70 [illegible]gem Alkohol die Bauchhöhle der [illegible] mit einem vor dem After beginnenden, ventralen Längsschnitt eröffnet worden. Dabei wurden wegen der bakteriellen Kontaminationsgefahr Darmverletzungen strikt [illegible] send mit sterilen Instrumenten ent[illegible] weiteren Verarbeitung in ein antibiotikahaltiges (Penicillin 200 I.E./ml, Streptomycin 200 I.E./ml, Neomycin 100 Gamma/ml, Mycostatin 100 Gamma/ml) PBS-Bad (Phosphate [illegible]; DULBECCO und VOGT, 1954), wurden dann mit einer sterilen Schere in 1-2 mm^3 große Stücke zerkleinert und daraufhin mehrmals in PBS gespült.

Die Organ- und Gewebestücke verblieben schließlich - um weitgehend steriles Ausgangsmaterial zu bekommen - für etwa 4 Stunden in frischer antibiotikahaltiger PBS-Lösung.

1-2 mm^3 große Stücke des Flossen-, Kiemen-, [illegible]- und [illegible]gewebes sowie Eier mit lebendem Inhalt kam[illegible] sterilisation für ca. 30 Sekunden in 70 % Alkohol + 0,05 % HgCl, anschließend für 1-2 Minuten in eine 3 %ige NaOCl-Lösung und verblieben dann 3-4 Stunden in antibiotikahaltiger PBS bei 4°C.

Aus den Eiern wurden nach Chorionentfernung die Embryonen entnommen und diese vom anhaftenden Dottersack befreit. Die zerkleinerten und in antibiotikahaltiger PBS gespülten

Gewebeteile sind in PBS bei 4°C für den Zellaufschluß aufbewahrt worden.

1.1.4. Gewebedissoziation

Die verwendeten Aufschlußmittel PBS-T (0,25 % Trypsin in PBS) und STV (Saline-Trypsin-Versen-Lösung nach MARKUS et al., 1956) sind - um weitgehend gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten - aus folgenden Stammlösungen jeweils frisch angesetzt worden:

Trypsin-Stammlösung (1,25 %ig)

Die Lösung von 12,5 g kristallinem Trypsin in 1000 ml aqua bidest. blieb über Nacht bei 4°C stehen, wurde nach Sterilfiltration in 100 ml Portionen abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

Saline-Stammlösung (10fach)

Die Lösung von 80 g NaCl, 4 g KCl, 3,5 g $NaHCO_3$ und 10 g Glucose in 1000 ml aqua bidest. kam nach Sterilfiltration in 100 ml Flaschen abgefüllt bei 4°C zur Aufbewahrung.

Versen-Stammlösung (1 %ig)

Die Lösung von 10 g Versen (Äthylen-diamintetraessigsäure EDTA) in 1000 ml aqua bidest. wurde im Dampftopf 20 Minuten lang sterilisiert, darauf in 100 ml Portionen abgefüllt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

PBS-T-Lösung (0,25 %ig)

1000 ml der gebrauchsfertigen PBS-T-Lösung (pH 7.4) setzten sich zusammen aus

200 ml der 1,25 %igen Trypsin-Stammlösung,
100 ml der 10fachen Saline-Stammlösung und
700 ml sterilem aqua bidest.

STV-Lösung (Trypsin 0,05 %ig, Versen 0,025 %ig)

1000 ml der gebrauchsfertigen STV-Lösung setzten sich zusammen aus

50 ml der 1,25 %igen Trypsin-Stammlösung,
25 ml der 1 %igen Versen-Stammlösung,
100 ml der 10fachen Saline-Stammlösung und
825 ml sterilem aqua bidest.

Sowohl der PBS-T-Lösung als auch der STV-Lösung sind vor Gebrauch jeweils 100 I.E. Penicillin und 100 Gamma Streptomycin je ml Lösung zugesetzt worden.

Zum Gewebeaufschluß sind die Organstückchen in einem Erlenmeyerkolben (250-750 ml) mit etwa 25 ml der PBS-T- oder STV-Lösung pro Gramm Organ überschichtet worden; ein Magnetrührer (100-200 ml U/M) unterstützte den Dispersionsvorgang.

Erfolgte der Aufschluß bei 4°C, so wurden zwei Fraktionen im 8stündigen Rhythmus abgenommen und getrennt angezüchtet. Die Zellsuspensionen der bei 25°C oder 28°C (Forellen-, Karpfen) bzw. 33°C (Karpfen) dissoziierten Gewebe wurden 4-5mal stündlich abgenommen und entweder gesammelt (nach Zugabe von 10 % Kälberserum und Aufbewahrung bei 4°C) oder sofort getrennt angezüchtet. Die einzelnen Abnahmen sind jeweils durch ein entsprechendes Volumen an frischer Dispersions-Lösung ersetzt worden.

1.1.5. Weiterbehandlung der aufgeschlossenen Zellen

Die Zellsuspensionen kamen nach erfolgtem Gewebeaufschluß durch ein 4-6faches steriles Mullfilter und das Filtrat wurde zentrifugiert (450xg, 5 Min.). Von dem im Anzuchtsmedium (1:20-1:100) aufgenommenen Zellsediment wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Zählkammer (NEUBAUR, FUCHS-ROSENTHAL) ermittelt.

Tote Zellen ließen sich von den lebenden infolge intensiver Blaufärbung durch die zugesetzte 2 %ige Trypanblaulösung (0,5 ml/1 ml Zellsuspension) unterscheiden.

Aus jeweils 3 Kammerauszählungen ist das arithmetische Mittel errechnet worden und die Zellzahl pro ml Medium wurde durch Zugabe eines bestimmten Volumens Anzuchtsmedium auf den gewünschten Wert gebracht. Je nach Verwendungszweck erfolgte die Einsaat verschiedener Zellsuspensionsmengen in folgende Zuchtgefäße:

Zuchtgefäße:	Zellfläche:	Mediummenge:
Rouxschalen	ca. 200 cm^2	100 ml
Demeterflaschen	ca. 40 cm^2	20 ml
Falconflaschen	ca. 25 cm^2	5 ml
Reagenzröhrchen	ca. 5-7 cm^2	1,5 ml
Leightonröhrchen	ca. 5 cm^2	1,5 ml
Petrischalen	ca. 27 cm^2	5 ml
Microplatten (Modell LIMBRO IS-MRC-96, Flow-Lab.,Bonn)	ca. 0,2 cm^2	0,2 ml

1.1.6. Inkubationstemperaturen

Routinemäßig sind Forellenzellen bei 20-22°C und Karpfenzellen bei 25° und 28°C gezüchtet worden. Zur Ermittlung der optimalen Zuchttemperatur wurden Forellen- und Karpfengonadenzellkulturen bei 4°, 15°, 20°, 22°, 25°, 28° und 33°C, Karpfenzellen zusätzlich auch bei 37°C inkubiert.

1.1.7. Verwendung organischer Puffer im Nährmedium mit verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen

Um die pH-Schwankungen der $NaHCO_3$-gepufferten Kulturmedien während des Zellwachstums (Initialalkalisierung durch CO_2-Verlust nach der Zelleinsaat und nachfolgende metabolische Acidose) weitgehend zu eliminieren und dadurch stabile Medien-pH-Werte zu erreichen, wurden folgende organische Puffer (EAGLE, 1971) dem Gebrauchsmedium EMEM (+0,2 % $NaHCO_3$, 10 % FKS, 0,5 % Laktalbumin, Antibiotika) zugesetzt:

PIPES (Piperazin-N-N'-bis-2-äthansulfonsäure)
BES (N,N'-bis-(2-hydroxyäthyl)-2-aminoäthansulfonsäure)
TES (N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfonsäure)
HEPES (N-2-hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure)
HEPPS (N-2-hydroxyäthylpiperazin-N'-2-propansulfonsäure)
TRICIN (N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin)

Die einzelnen Puffersubstanzen wurden jeweils als 1-molare Stammlösungen angesetzt. Nach Sterilfiltration kamen die Stammlösungen in den unter Tabelle 7 aufgeführten Kombinationen und Endkonzentrationen (in Millimol) zu den Anzuchtsmedien (EMEM, s.S.4o) hinzu. Mit steriler 0,3 n HCl bzw. 0,3 n NaOH wurden die Medien-pH-Werte auf 6,6 - 7,0 - 7,4 - 7,8 - 8,2 eingestellt.
Zur Kontrolle ist eine unveränderte EMEM-Nährlösung ($NaHCO_3$-gepuffert, pH 7,5) mitverwendet worden.

Tabelle 7

Kombinationen der verwendeten organischen Puffer (EAGLE, 1971) in Millimolendkonzentrationen in den mit 0,3 n HCl bzw. 0,3 n NaOH auf die verschiedenen pH-Werte eingestellten Medien.

		eingestellter Medien-pH-Wert				
Puffer	pKa	6,6	7,0	7,4	7,8	8,2
PIPES	6,8	5mM	5mM	-	-	-
BES	7,15	-	5mM	5mM	-	-
TES	7,5	-	-	5mM	5mM	-
HEPES	7,55	-	5mM	7,5mM	7,5mM	5mM
HEPPS	8,0	-	-	-	5mM	5mM
TRICIN	8,15	-	-	-	-	7,5mM
*NaH_2PO_4	6,7	5mM	5mM	2,5mM	-	-

*essentielle Zugabe

Der Einfluß verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen auf das Zellwachstum wurde ermittelt, indem primäre Gonadenzellen der Regenbogenforelle ($2x10^5$ Zellen/ml) mit Medien der verschiedenen pH-Werte 6,6 - 7,0 - 7,4 - 7,5 - 7,8 - 8,2 in Falcon-Flaschen (25 cm^2) bei 22°C angezüchtet wurden. Die Bestimmung der Zellzahl und die Medium-pH-Wert-Messungen erfolgten während der 5tägigen Versuchsdauer im 24stündigen Rhythmus.

1.2. Subkulturen

Zur weiteren Vermehrung wurden die Zellen dichtgewachsener Kulturen in neue Kulturgefäße übertragen.
Nach Mediumabguß ist der Zellrasen mit einer antibiotikahaltigen STV-Lösung (Saline Trypsin-Versen-Lösung, s.S. 43) für etwa 10 Minuten bei Zimmertemperatur überschichtet worden. Die vorsichtig von der Zuchtunterlage abgeschüttelten Zellen wurden anschließend durch Zentrifugieren (450xg, 5 Min.) sedimentiert, in entsprechender Teilungsrate (1:2-1:3) im Anzuchtsmedium resuspendiert, in neue Kulturgefäße wieder eingesät und inkubiert.

1.3. Zell-Linien

Wegen der teilweise erschwerten Beschaffung von frischem Ausgangsmaterial für Primärkulturen und für vergleichende Untersuchungen, wurden besonders für das virologische Arbeiten die permanenten Zellen der RTG-2-Zell-Linie (CCL-55), (WOLF und QUIMBY, 1962) und der FHM-Zell-Linie (CCL-42), (GRAVELL und MALSBERGER, 1965) verwendet.

Die RTG-2-Zell-Linie, im Jahre 1960 von WOLF und QUIMBY aus Forellengonaden (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) gezüchtet, zeigt einen reinen fibroblastenähnlichen Wuchstyp und wird gewöhnlich mit Eagle's Minimal Essential Medium (EAGLE, 1959) + 10 % FKS bei 15-22°C (4-26°C) gezüchtet. Die RTG-2-Zellen wurden von V. JØRGENSEN, Århus, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die FHM-Zell-Linie konnte 1965 von GRAVELL und MALSBERGER aus Zellen von caudalem Gewebe des Cypriniden P i m e p h a l e s p r o m e l a s (Fathead minnow) etabliert werden. Die Zellen wachsen epithelartig und werden meist mit Eagle's Minimal Essential Medium (EAGLE, 1959) + 10 % FKS bei Temperaturen zwischen 15-33° (0-36°C) gezüchtet. Die Zell-Linie ist entgegenkommenderweise von N.FIJAN, Zagreb, zur Verfügung gestellt worden.

1.4. Lagerung und Konservierung von Zellen und Gewebe

1.4.1. Lagerung von suspendierten Zellen und Einschichtzellkulturen bei 4°C

Primäre und sekundäre Herz-, Gonaden- und Schwimmblasenzellkulturen von Forellen und Karpfen sowie RTG-2- und FHM-Zellen sind bei einer 60-80 %igen Kulturdichte ohne Mediumwechsel über verschieden lange Zeiträume bei 4°C gelagert worden.

Die in einem etwa 14tägigen Rhythmus entnommenen Kulturen verblieben zunächst ohne Mediumwechsel 3 Tage bei Anzuchtstemperatur, wurden anschließend nach der unter 1.5. beschriebenen Methode subkultiviert und neu angezüchtet.
Außerdem kamen in 10 ml Anzuchtsmedium (TC 199+20 % KS) suspendierte primäre und sekundäre Forellengonadenzellen in einer Konzentration von 9×10^5 Zellen/ml, in Reagenzgläsern bei 4°C zur Aufbewahrung. Nach einer 2 Monate dauernden Lagerung erfolgte die Neuanzüchtung der Zellen.

1.4.2. Konservierung von Zellen und Gewebe bei -70°C

Sowohl Gewebestücke als auch Zellen von Gonaden und Schwimmblasen der Regenbogenforelle und des Karpfens sind bei -70°C für Lagerungszwecke eingefroren worden.

Zellen

Die Zellen dichter Kulturen wurden mit STV-Lösung (s.S. 43) von der Zuchtunterlage abgelöst (s. 1.5.), zentrifugiert (450xg, 5 Min.) und in DMSO-haltigem Medium (EMEM, HMEM,

TC 199, + 10-20 % FKS + 10 % DMSO) resuspendiert. Die auf $3x10^6$Zellen/ml eingestellte Suspension (ampulliert zu 1 ml Portionen) kamen zunächst für 3 Stunden bei 4°C zur Lagerung und anschließend zur Tiefgefrierkonservierung bei -70°C. Proben wurden nach einer 30tägigen Lagerung bei -70°C entnommen, rasch in einem Wasserbad (20°C) unter Schütteln wieder aufgetaut, zur Feststellung der Überlebensrate gezählt und in verschiedenen Zellkonzentrationen ($2x10^4$, $7x10^4$, $1x10^5$, $1,5x10^5$, $2x10^5$ Z/ml) angezüchtet. Im Anzuchtsmedium (TC 199, HMEM, EMEM) verbliebenes Konservierungsmittel (DMSO) ist durch Mediumwechsel (8 Stunden nach der Zelleinsaat) entfernt worden. Das Zellwachstum wurde täglich eine Woche lang optisch kontrolliert.

Gewebe

1-3 mm^3 große Schwimmblasen- und Gonadenteile von Forellen und Karpfen wurden mit DMSO-haltigem Medium (EMEM, HMEM, TC 199 + 10-20 % FKS + 10 % DMSO) im Verhältnis 1:5 in 100 ml Flaschen eingefüllt und nach einer 3stündigen Lagerung bei 4°C bis -70°C eingefroren. Nach 14tägiger Tiefgefrierkonservierung kamen die im 20°C Wasserbad rasch aufgetauten und dreimal in PBS gewaschenen Organstückchen zur Trypsinierung. Das Gewebe ist hierzu mit PBS-T (s.S. 42) bei Zimmertemperatur zwei Stunden lang mit zwei Abnahmen aufgeschlossen worden. Die Zellsuspension wurde darauf zentrifugiert (450xg, 5 Min.), das Zellsediment mit Anzuchtsmedium (EMEM, HMEM, TC 199) auf $8x10^5$Zellen/ml Medium eingestellt, in Falconflaschen eingesät (5 ml) und bei 22°C inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte nach der unter 1.5. aufgeführten Methode.

1.5. Histologische Untersuchungen

1.5.1. Herstellung von Zellkulturpräparaten

Cytologische und virologische Untersuchungen erfolgten sowohl an ungefärbten Nativ-, als auch an fixierten und gefärbten Zellkulturpräparaten.

Zur Herstellung der Nativpräparate sind dicht bewachsene Deckglaszellkulturen aus den Kulturgefäßen (Leighton tubes) entnommen und einige Male in PBS gewaschen worden. Anschliessend wurden die Deckglaskulturen mit der Zellseite nach unten auf einen mit PBS benetzten sauberen Objektträger aufgelegt und kamen sofort zur mikroskopischen Betrachtung.

Zur Untersuchung einzelner Zellstrukturen war es meistens notwendig, die Kulturen anzufärben. Hierzu wurden die aus den Kulturgefäßen entnommenen und mehrmals in PBS gewaschenen Deckglaszellkulturen 30 Minuten lang in BOUIN's-Lösung (15 T gesättigte Pikrinsäurelösung, 5 T Formaldehyd (40 %ig), 1 T Eisessig) fixiert. Die Anfärbung der fixierten Kulturen erfolgte mit Hämatoxilin nach DELAFIELD (8 Minuten) und Eosin (20 Minuten). In Kanadabalsam eingebettet waren die Präparate unbegrenzt haltbar.

Bei Röhrchenkulturen ohne Deckgläser wurden die Zellen zur Färbung mit der Zelloidinmethode aus den Zuchtgefäßen wie folgt entnommen:

Zunächst sind die Zellen im Röhrchen wie oben beschrieben fixiert worden. Nach Entfernung des Fixierungsmittels wurden die Kulturen zweimal mit Aceton (1-2 Minuten) entwässert und mit 3 ml Zelloidin-Lösung (7,5 %ig in einer Mischung aus gleichen Teilen Alkohol abs. und Äther) pro Reagenzglas beschickt. Die verschlossenen Röhrchen kamen für 30 Minuten in einen Rollerapparat (2 U/M) und wurden daraufhin nach Abgießen des überschüssigen Zelloidins luftgetrocknet. Anschließend sind die Zuchtgefäße einmal mit Leitungswasser gespült worden und der Zelloidinfilm mit den anhaftenden Zellen wurde vorsichtig mit einer Pinzette von der Glaswand abgelöst und aus den Röhrchen entnommen. Der die Zellen enthaltende Filmanteil kam mit der Zellschicht nach unten auf einen mit Wasser benetzten Objektträger und wurde zwischen Filterpapier fest angedrückt. Nach Überschichtung der Präparate mit 2-3 Tropfen Nelkenöl, welches durch dreimaliges Waschen in 96 %igem Alkohol nach 10 Minuten wieder entfernt wurde, erfolgte in

einem 10minutigen Bad (dreimaliger Wechsel), bestehend aus gleichen Teilen Alkohol und Äther, die Herauslösung des Zelloidinfilms. Die so behandelten Präparate sind nach der oben beschriebenen Technik mit Hämatoxilin-Eosin angefärbt und darauf in Kanadabalsam eingebettet worden.

1.5.2. Chromosomendarstellung

Zur Darstellung der Chromosomen von i n v i t r o kultivierten Fischzellen ist eine modifizierte Methode in Anlehnung an SCHWARZACHER und WOLF (1970) sowie BEHREND und MAULER (1970) angewandt worden.

Es wurden Zellen von Gonaden- und Schwimmblasenkulturen der Regenbogenforelle (vor 6 Monaten angelegt, 7. Subkultur) und Zellen der RTG-2-Linie (106. Subkultur) zur Chromosomenanalyse herangezogen.

Die Kulturen, nach Standardmethoden in Roux-Flaschen gezüchtet, sind zunächst - um einen möglichst großen Anteil an mitotisch aktiven Zellen zu erhalten - nach der unter 1.2. beschriebenen Methode 1:2 subkultiviert worden. Nach 40stündiger Inkubation bei 22°C wurde ein Mediumwechsel mit einer colchizinhaltigen (Endkonzentration von 0,4 ug je ml) Hank's-Lösung (+10 % KS + 0,5 % LA) vorgenommen.
Das colchizinhaltige Medium wurde nach 4,5stündiger Einwirkungszeit wieder abgegossen und die mit STV (s. 1.2.) abgelösten Zellen sind nach Sedimentation (450xg, 5 Min.), mit 5 ml Hanks' Lösung pro Roux-Flasche zweimal gewaschen worden. Nach erneuter Zentrifugation (250xg, 10 Min.) wurde der Überstand bis auf 1 ml abgenommen. Die hypotone Behandlung der Zellen erfolgte durch langsames Hinzufügen von 5 ml aqua bidest, dessen pH mit Ammoniak auf einen Wert von 7,2 gebracht worden war. Darauf kam die Zellsuspension für 30 Minuten zur Inkubation bei 28°C.
Anschließend ist nach Sedimentation (250xg, 5 Min.) der Überstand wieder abgesaugt worden und das Zellsediment wurde mit

5 ml Fixativ (1 T Eisessig, 3 T Methanol) - ohne die Zellen dabei aufzuwirbeln - überschichtet und für 30 Minuten bei 4°C mit zweimaligem Fixativwechsel inkubiert. Nach Zentrifugation (250xg, 5 Min.) und Abnahme des Überstandes bis auf 0,5 ml wurde das Zellsediment vorsichtig resuspendiert. In diesem Zustand konnte das Untersuchungsmaterial bei 4°C mehrere Tage ohne Beeinträchtigung der Chromosomendarstellung aufbewahrt werden.

Für die Präparateherstellung sind etwa 3 Tropfen der Zellsuspension sofort auf einen mit aqua bidest. benetzten und bei -20°C gehaltenen fettfreien Objektträger aufgetragen worden.

Zur Anfärbung der Chromosomen kamen anschließend die luftgetrockneten Präparate für 30 Minuten in ein saures Orceinbad und wurden danach 1 Minute lang in 70 %igem Alkohol differenziert. Nach aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Einbettung der Präparate in Kanadabalsam.

Orceinlösung

2 g Orcein wurden in 100 ml einer 50 %igen Essigsäure 30 Minuten lang mit Siedesteinchen unter dem Abzug gekocht und nach Erkalten filtriert.

2. ERGEBNISSE

2.1. Kulturansatz aus Gewebe der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich.)

2.1.1. Anzüchtbarkeit verschiedener Gewebearten

Bei der Auswahl geeigneten Kulturmaterials wurde hauptsächlich auf die nach Standardtrypsinierungsmethoden reproduzierbaren Anzuchtserfolge Wert gelegt. Hierbei erwiesen sich lediglich Ovarien-, Hoden-, Herz-, Schwimmblasen- sowie embryonales Gewebe als geeignet. Alle anderen Organe und Gewebearten erbrachten mit dem angewandten Kultivierungsverfahren nur mangelhafte Anzuchtsresultate.

Ovarien lieferten die besten Kulturergebnisse. Die Kulturen wuchsen in allen Fällen ohne Schwierigkeiten in 48 Stunden dicht. In den Primärkulturen traten neben epithelartigen, fibroblastenähnliche Zellen auf (Abb. 1+2).

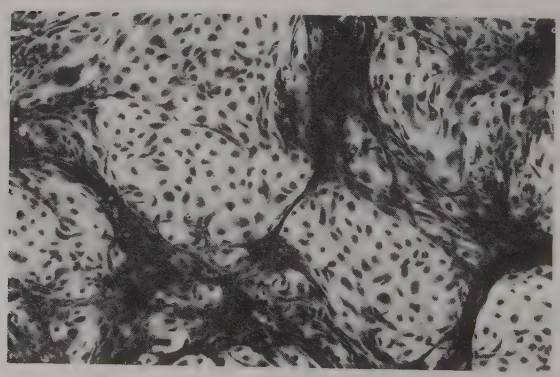

Abb. 1 Primäre Forellengonadenzellkultur, 22°C, 3 Tage alt, fibroblasten- und epithelartiger Zelltyp, HE-Färbung, ca. 60 x

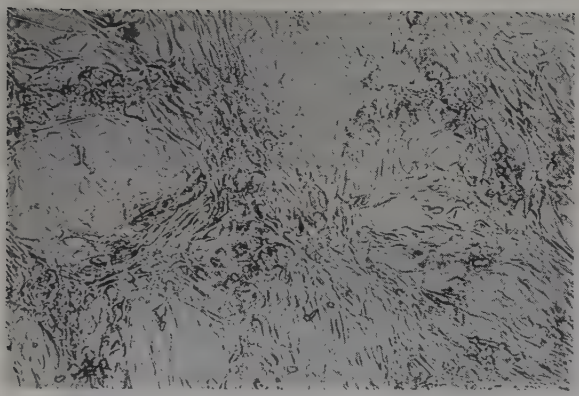

Abb. 2 Primäre Forellengonadenzellkultur, 22°C, 3 Tage alt, fibroblasten- und epithelartiger Zelltyp, nativ, ca. 60 x

Hodenzellen noch nicht geschlechtsreifer Fische erbrachten ebenso gute Kulturerfolge. Ungeeignet für einen Ansatz waren Hoden mit reifen Spermatozoen ("Milchner"). Die Zellmorphologie entsprach weitgehend der der Ovarienzellkulturen.

Schwimmblasenzellen ließen sich in allen Fällen kultivieren. Primär- und Subkulturen wiesen eine einheitliche, fibroblastenähnliche Zellmorphologie auf (Abb. 3)

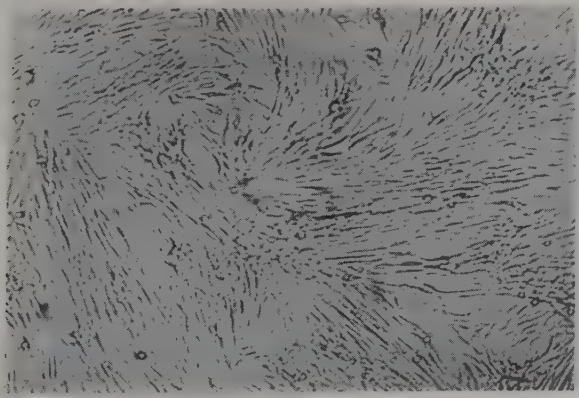

Abb. 3 Primäre Forellenschwimmblasenzellkultur, 22°C, 3 Tage alt, fibroblastenartiger Zelltyp, nativ, ca. 30 x

Herzzellen konnten nur dann angezüchtet werden, wenn bei der Gewebedissoziation die lebenden Zellen nach mikroskopischer Kontrolle gezielt abgenommen und die vorhandenen Blutkörperchen gründlich ausgewaschen wurden. Bei Primärkulturen überwogen hauptsächlich epithelartige Zellen (Abb. 4), die aber im Laufe der weiteren Subkultivierung in einen fibroblastenartigen Wuchstyp übergingen.

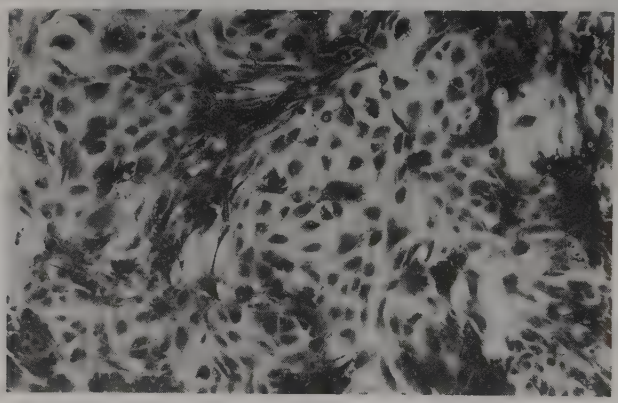

Abb. 4 Primäre Forellenherzzellkultur, 22°C, 3 Tage alt, epithelartiger Zelltyp, HE-Färbung, ca. 80 x

Die Zellen von Eiembryonen kurz vor dem Schlüpfen (ca. 18 Tage alt) lieferten in der Regel nach 48 Stunden dichte Mischkulturen, wobei der fibroblastenähnliche Zelltyp zu überwiegen schien (Abb. 5).

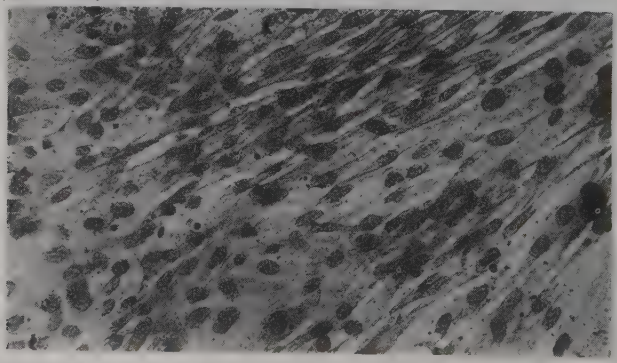

Abb. 5 Primäre Zellkultur von Forellenembryonen, 22°C, 3 Tage alt, fibroblastenähnlicher Zelltyp, HE-Färbung, ca. 150 x

Hinsichtlich der Zellmorphologie wurden hauptsächlich fibroblastoide, epitheloide oder gemischte Wuchsformen beobachtet. Es fiel auf, daß in Zellpopulationen von Primärkulturen homologer Ausgangsgewebe oftmals unterschiedliche Zelltypen hervortraten. Diese Heterogenität der Primärkultur wird wahrscheinlich durch den physiologischen Zustand (z.B. Reifungsgrad der Gonaden) bestimmt, in welchem sich die Zellen vor der Kultivierung befunden hatten.

2.1.2 Gewebedissoziation

Gonaden-, Schwimmblasen-, Herz- sowie embryonales Gewebe konnten sowohl mit PBS-T (0,25 % Trypsin in PBS) als auch mit STV (0,05 % Trypsin und 0,025 % Versen in PBS) bei verschiedenen Temperaturen (4°-25°C) mit guter Ausbeute an lebens- und wachstumsfähigen Zellen aufgeschlossen werden (Tab. 8 und 9).

Das Trypsinierungsergebnis des Nieren-, Leber-, Milz-, Gehirn-, Muskel- und Hautgewebes war dagegen unbefriedigend, da von den dispergierten Zellen nur etwa 5-10 % überlebten. Auch kurze Aufschlußzeiten von 10-20 Minuten bei niederen Temperaturen (4°C) erbrachten keine besseren Resultate. Der hohe Anteil an Zelldetritus und toten Zellen verhinderte stets die Ausbildung eines intakten Zellrasens.
Außerdem gelang es nicht, Kiemen- oder Flossengewebe mit den genannten Aufschlußmitteln zu Einzelzellen zu dispergieren. Selbst Langzeittrypsinierungsversuche (12 Stunden bei 25°C) blieben erfolglos.

Die Ausbeute an lebenden und vermehrungsfähigen Zellen war vom Alter, Gewicht, aber auch vom physiologischen Zustand des Fisches und von den Dispersionsbedingungen wie Temperatur, Enzymaktivität u.a. abhängig.

Durchschnittlich lieferten die mit 0,25 %igem Trypsin fraktioniert bei Raumtemperatur aufgeschlossenen Organe 1-2jähriger Forellen etwa $1-5 \times 10^{7}$ Gonaden-, $8-10 \times 10^{6}$ Schwimmblasen- und $2-4 \times 10^{6}$ Herzzellen pro Fisch. Bei Verwendung von Gewebe jüngerer Tiere verringerte sich die Zellausbeute etwa um

eine 10er Potenz (Tabelle 8).

Tabelle 8

Durchschnittliche Zellausbeute verschiedener, mit 0,25 %igem Trypsin bei Raumtemperatur aufgeschlossener Gewebearten. Die Angaben sind pro Fisch verschiedener Altersstufen bezogen.

Gewebe	Durchschnittliche Ausbeute an lebenden Zellen pro Fisch bei 1-2jährigen Speiseforellen	Fingerlingen
Gonaden	$1-5 \times 10^7$	$1-4 \times 10^6$
Schwimmblase	$8-10 \times 10^6$	$8-10 \times 10^5$
Herz	$2-4 \times 10^6$	$1-2 \times 10^5$

Temperatur und Zeit beeinflußten den Trypsinierungsprozeß entscheidend.
Bei der Ermittlung optimaler Gewebeaufschlußtemperaturen stand weniger eine mengenmäßig große Gesamtzellausbeute oder die Geschwindigkeit der Reaktion, als vielmehr die Lebensfähigkeit und Anzüchtbarkeit der dispergierten Zellen im Vordergrund.
Es wurde ermittelt, daß für Forellengewebe Aufschlußtemperaturen von über 25°C ungeeignet sind. Zwar konnten bei höheren Temperaturen größere Zellmengen freigesetzt werden (Abb. 6), doch überwog auch entsprechend der Anteil der toten Zellen. Bereits eine Aufschlußtemperatur von 28°C schädigte die Zellen irreversibel.

Gute Ergebnisse hinsichtlich der Zellausbeute sowie der Anzüchtbarkeit sind sowohl bei 20-25°C, als auch bei 4°C erzielt worden, wenn das Gewebe in einzelnen, aufeinanderfolgenden Fraktionen (fraktionierte Trypsinierung) aufgearbeitet wurde. So konnten bei einem 25°C-Aufschluß mit stündlicher Abnahme einer Fraktion etwa 4×10^6 Gonaden- oder 2×10^7 Schwimmblasen- bzw. Herzzellen pro 1 Gramm Gewebe gewonnen werden.

Bei 4°C wurden während einer 20stündigen Dispersion mit insgesamt 2 Abnahmen annähernd gleiche Zellerträge erzielt (Tabelle 9). Wegen des geringeren Arbeitsaufwandes sowie der verminderten Kontaminationsgefahr scheint jedoch die Kältetrypsinierung die Methode der Wahl zu sein.

Tabelle 9

Fraktionierter enzymatischer (0,25 % Trypsin) Aufschluß von Gonaden-, Schwimmblasen- und Herzgewebe juveniler und adulter Forellen bei 25°C und 4°C.

Aufschluß				durchschnittliche Zellausbeute pro 1 Gramm Gewebe			
Temperatur	Dauer	Abnahmen	Anzuchtserfolg	Gonaden	Schwimmblasen	Herz	Forellenalter
25°C	4 Std.	4	gut	$4x10^6$	$2x10^7$	$2x10^7$	adult
4°C	20 Std.	2	gut	$8x10^6$	$2x10^7$	$1x10^7$	adult
25°C	4 Std.	4	sehr gut	$3x10^7$	$2x10^7$	$2x10^7$	juvenil
4°C	20 Std.	2	sehr gut	$5x10^7$	$3x10^7$	$2x10^7$	juvenil

Der Zelldissoziationsgrad (Abb. 6) stieg bei den gewählten Aufschlußtemperaturen von 28° (keine Fraktion anzüchtbar) bzw. 25°C (alle Fraktionen anzüchtbar) während der ersten 60 Minuten exponentiell an. Danach bildete sich ein annähernd gleichbleibendes Plateau aus. Längere Anschlußzeiten scheinen demnach die Gesamtzellausbeute bei den genannten Temperaturen nicht wesentlich zu beeinflussen.

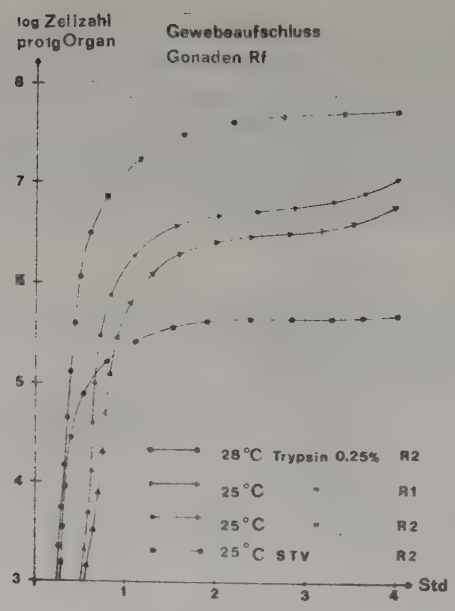

Abb. 6 Gewebeaufschluß von Forellengonaden bei Raumtemperatur mit 0,25 %iger Trypsin-PBS-Lösung und STV-(Saline-Trypsin (0,05 %)-Versen (0,025 %)-Lösung (s.S. 42/43)
R_2= etwa 2jährige Forellen
R_1= etwa 1jährige Forellen
Die bei 28°C trypsinierten Zellen ließen sich nicht anzüchten.

Wegen der sich bei der Kältetrypsinierung ausbildenden retardierten Zellfreisetzung (Abb. 7) spielt im Gegensatz zum 25°C-Aufschluß der Faktor "Zeit" eine wesentliche Rolle; denn erst nach einer 20stündigen Trypsinierungsdauer bei 4°C wurden annähernd gleiche Zellmengen dispergiert, wie sie bei 25°C bereits nach einer Stunde resultierten.

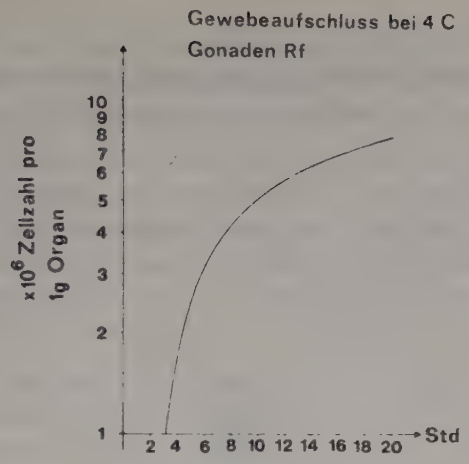

Abb. 7 Gewebeaufschluß von Forellengonaden bei 4°C mit 0,25 %iger Trypsin-PBS-Lösung.

Bei der Verwendung von STV (s.S. 43) als Dispersionsmittel ist im Durchschnitt eine etwa um 20-30 % geringere Zellausbeute erzielt worden (Abb. 6). Allerdings schienen die so aufgeschlossenen Zellen eine besonders gute Vermehrungsfähigkeit zu besitzen. Inwieweit die Verwendung des Chelierungsmittels Versen (Ausschwemmung intra- und extrazellulärer Ca^{++} und Mg^{++}-Ionen) in der Dispersionslösung das Zellwachstum zu stimulieren vermag, ist nicht geklärt.

2.1.3. Zelleinsaatmenge

Das Kulturwachstum war von der Initialeinsaatmenge an lebenden Zellen stark abhängig. Während z.B. Gonadenzellen mit einer Einsaat von mehr als 1×10^6 Zellen/ml Medium innerhalb 24 Stunden zu einem dichten Zellrasen auswuchsen, reichten weniger als 2×10^4 Zellen/ml als Einsaatmenge nicht mehr aus, um innerhalb von 7 Tagen dichte Einschichtkulturen zu liefern. Wurden weniger als 1×10^4 Zellen/ml eingesät, so resultierten Zellinseln, die eine begrenzte Zeit lebensfähig waren, sich nicht merklich vermehrten und nach zwei Wochen schließlich

degenerierten.
In Abb. 8 ist die Abhängigkeit der Zelleinsaatzahl zur Kulturdichte am Beispiel der Gonadenzellen dargestellt.

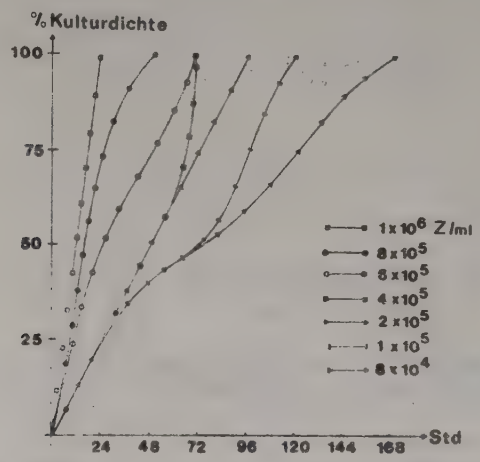

Abb. 8 Forellengonadenzellwachstum bei 22°C in Abhängigkeit von der Zelleinsaatmenge.

Um innerhalb 72-96 Stunden dichte Zellkulturen zu erhalten, wurden für die Zellen verschiedener Gewebe nachstehende Einsaatmengen ermittelt:

Gonadenzellen	2-4 x 10^5 Z/ml
Schwimmblasen	8-10x 10^5 Z/ml
Herzzellen	6-8 x 10^5 Z/ml
Zellen von Embryonen	8-10x 10^5 Z/ml

2.1.4. Zellwachstum bei verschiedenen Temperaturen

Als günstigste Anzuchtstemperaturen für Forellengewebe erwiesen sich 20-22°C. In diesem Temperaturbereich wurden die höchsten Wachstumsraten erzielt. Die bei 25°C inkubierten Kulturen wuchsen zwar in annähernd gleicher Zeit dicht, degenerierten aber wesentlich schneller. 28°C wurde von den

Zellen nicht mehr toleriert; sie lösten sich innerhalb von 24 Stunden von der Unterlage ab und waren danach nicht mehr lebensfähig.

Bei 15°C wiesen die Kulturen eine um etwa 50 % - gegenüber der Optimaltemperatur von 22°C - geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf und neigten zur Aggregatbildung. Bei 4°C war die Zellvermehrungsintensität merklich reduziert (50-70 %), die Zellen behielten aber über längere Zeiträume (3-6 Monate) hinweg ihre Vermehrungsfähigkeit bei.

Am Beispiel der Gonadenzellen ist in Abb. 9 die Zellvermehrung während einer 72stündigen Inkubationsdauer bei verschiedenen Temperaturen dargestellt.

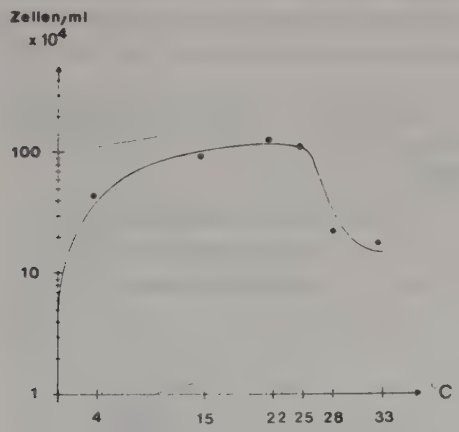

Abb. 9 Forellengonadenzellwachstum bei verschiedenen Temperaturen während einer 72stündigen Inkubation.

2.1.5. Zellvermehrung mit verschiedenen Medien

Bei den verwendeten halbsynthetischen Medien

TC 199 (= Medium 199 + 20 % KS)
L_{15} (= Leibovitz-Medium + 10 % KS)
Earle (= Earle's Salzlösung + 10 % KS + 0,5 % LA)
EMEM (= Earle-MEM + 10 % KS + 0,5 % LA)
HMEM (= Hanks'-MEM + 10 % KS + 0,5 % LA)

traten hinsichtlich der Zellvermehrungsrate nur geringfügige Unterschiede auf.
Am besten wuchsen primäre Zellkulturen aus Gonadengewebe mit den Medien TC 199, L_{15} und HMEM (Abb. 10), aus Schwimmblasengewebe mit HMEM und L_{15} (Abb. 11), aus Herzgewebe mit HMEM und aus embryonalem Gewebe mit TC 199. Doch scheint die Auswahl eines auf einen bestimmten Zelltyp entsprechend abgestimmtes Nährmedium nicht notwendig zu sein, da die Medien ohne sichtbare Wachstumsveränderungen für die Zellen austauschbar sind.

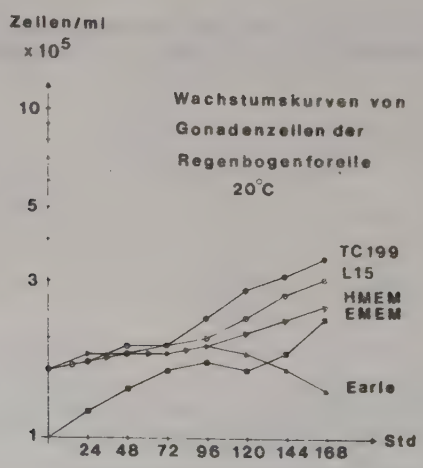

Abb. 10 Wachstumskurven von Gonadenzellen der Regenbogenforelle mit verschiedenen Zellkulturmedien bei 20°C.

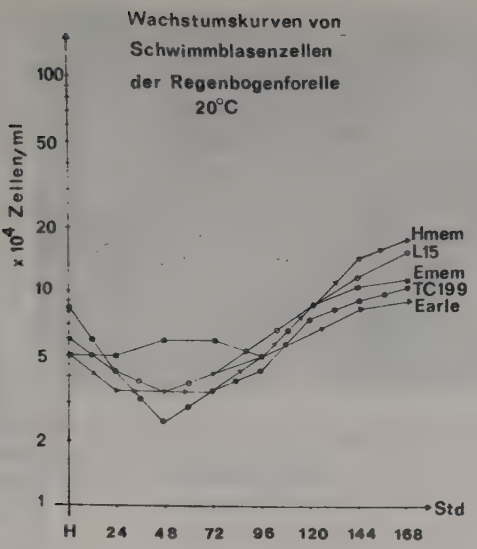

Abb. 11 Wachstumskurven von Schwimmblasenzellen der Regenbogenforelle mit verschiedenen Zellkulturmedien bei 20°C.

Nach der Zelleinsaat war allgemein eine 5-10 Stunden dauernde Ruhephase (mit Zellhaftung und Anpassung an das Medium) zu beobachten. Danach vermehrten sich die Zellen und wuchsen mit allen verwendeten Medien in durchschnittlich 24-96 Stunden zu einem dichten Zellrasen aus. Auffallend war, daß mit TC 199 und L_{15} gezüchtete primäre Gonadenzellkulturen hauptsächlich Zellen von epithel- und fibroblastenähnlichem Wuchstyp aufwiesen, während bei den mit EMEM, HMEM und Earle gezüchteten Kulturen vorwiegend epithelartige, teilweise polygonale und vakuolisierte Zellen vorkamen. Dies trat besonders bei den mit Earle gezüchteten Zellen in Erscheinung (Abb. 12 und 13) und ist wahrscheinlich auf ein zu geringes Nährstoffangebot zurückzuführen.

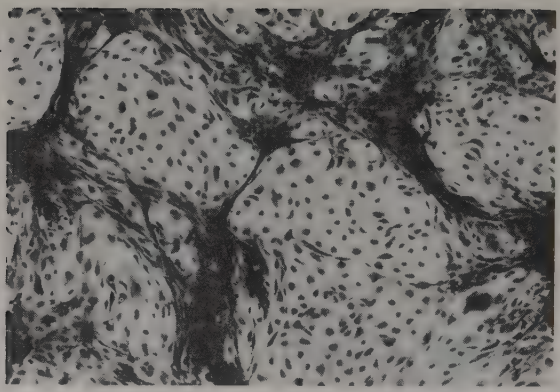

Abb. 12 Primäre Forellengonadenzellkultur mit Medium TC 199 + 20 % Kälberserum bei 22°C gezüchtet, 3 Tage alt, gemischter Zelltyp, HE-Färbung, ca. 60 x

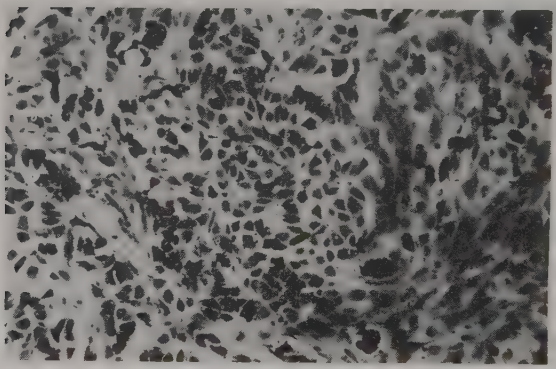

Abb. 13 Primäre Forellengonadenzellkultur mit EARLE's Salzlösung + 10 % Kälberserum + 0,5 % Laktalbumin bei 22°C gezüchtet, 3 Tage alt, polygonale Zellen, HE-Färbung, ca. 60 x

Kälberserum (KS) in 10-20 %iger Konzentration förderte die Zellvermehrung wesentlich besser als gleiche Mengen eines homologen (Forellenserum) bzw. heterologen (Karpfenserum) Fischserums.

Bei Verwendung von vorgetestetem normalem (KS) und fötalem Kälberserum (FKS) traten hinsichtlich des wachstumsstimulierenden Effektes keine signifikanten Unterschiede auf. Die Zellvermehrung bei verschiedenen Kälberserumkonzentrationen im Medium ist in Abb. 14 dargestellt. Es zeigte sich, daß Serumzusätze zwischen 5 und 20 % das Zellwachstum nicht wesentlich beeinflussen.

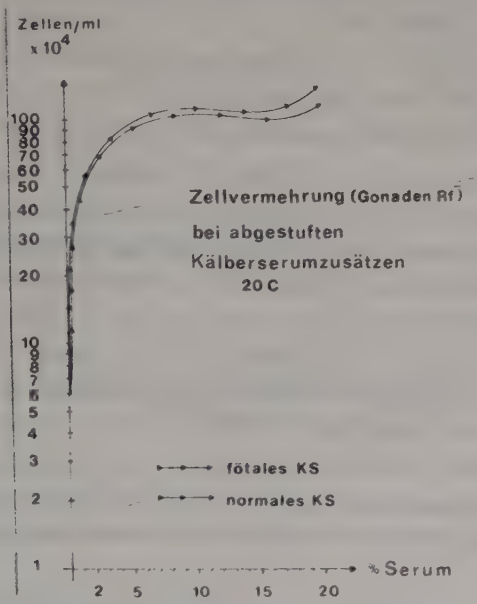

Abb. 14 Wachstumskurven von Gonadenzellen der Regenbogenforelle bei 20°C mit unterschiedlich hohen Kälberserumanteilen (KS) im Medium.
Obere Kurve: fötales KS
Untere Kurve: normales KS

Zur Erzielung guter Zellvermehrungsraten ist ein 5-10 %iger Serumzusatz im Nährmedium unerläßlich. Fötales Kälberserum (FKS) weist zwar gegenüber dem vorgetesteten normalen KS keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 14), es ist aber die Verwendung von FKS vorzuziehen, da hier Qualitätsschwankungen in weit geringerem Maße als beim KS auftreten.

Um dichtgewachsene Zellkulturen über längere Zeiträume hinweg zu erhalten, wurde der Serumanteil im Medium auf 3 % reduziert (Erhaltungsmedium). Es konnten die mit den Medien TC 199, HMEM, EMEM und L_{15} behandelten Zellen ohne weitere Mediumwechsel bei Zuchttemperatur (20-22°C) bis zu 60 Tage in einem guten Zustand gehalten werden. Dagegen traten aber die mit Earle gezüchteten Zellen bereits nach etwa 10 Tagen in die degenerative Phase ein.

Bei den Medien, die auf der Salzgrundlage von EARLE und HANKS beruhten, schien sich der Zusatz von 0,5 % Laktalbuminhydrolysat (LA) auf das Zellwachstum günstig auszuwirken.

Eiultrafiltrat wirkte sich in 5-10 %iger Konzentration im Medium besonders wachstumsstimulierend auf die Zellen aus. Es gelang z.B. durch eine einmalige Anwendung dieses Mediumzusatzes Kulturen, die in die regressive Phase abgerutscht waren, zu regenerieren.

2.1.6. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration der Nährmedien auf das Zellwachstum

Im allgemeinen schien es nicht notwendig, das Medium pH auf definierte Werte einzustellen, da in einem pH-Bereich von 6,6 - 7,9 keine signifikanten Wachstumsunterschiede beobachtet wurden.
Lediglich pH-Werte unterhalb 6,6 und über 8,5 verminderten die Zellvermehrung merklich. Primärzellen vermehrten sich am besten bei einem Medium-pH von 7-7,8. Im sauren (um pH 6) sowie im alkalischen (um pH 8) pH-Bereich waren die Zellen teilweise granuliert und vakuolisiert. Gewöhnlich trat nach der Zelleinsaat bei allen Medien eine Initialalkalisierung auf. Der Medien-pH-Anstieg nach der Zellhaftung (5-10 Stunden nach Einsaat) gegenüber dem Ausgangswert ist aus Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10

Anstieg der pH-Werte verschiedener Medien nach Zelleinsaat

Medium	Ausgangs-pH-Wert	pH-Wert nach Zellhaftung
Earle	7,5	7,9
EMEM	7,3	7,9
HMEM	7,45	7,95
TC 199	7,5	7,85
L_{15}	7,85	7,90

Während eines 8tägigen Zellwachstums blieb der pH-Wert der $NaHCO_3$-gepufferten Medien zunächst weitgehend im Bereich der Werte nach der Zellhaftung, sank dann mit zunehmender Populationsdichte wieder etwas ab. Ältere ohne Mediumwechsel gehaltene dichte Kulturen hatten meist Medium-pH-Werte um 7; die Zellen nahmen nach Subkultivierung das normale Wachstum wieder auf.

Die mit den organischen Puffern (EAGLE, 1971) versehenen Kulturmedien waren hinsichtlich der pH-Stabilität sowie des Zellwachstums den $NaHCO_3$-gepufferten Medien nicht überlegen.

Bei den auf die pH-Werte 6,6 - 7,0 - 7,4 - 7,8 - 8,2 eingestellten organisch gepufferten Medien trat wie beim $NaHCO_3$-gepufferten Medium nach der Zellhaftung eine leichte Verschiebung ins Alkalische auf. Während des Zellwachstums von der 24. bis zur 120. Stunde nach der Zelleinsaat veränderten sich aber die pH-Werte der Medien nicht mehr.

Wie aus Abb. 15 hervorgeht, vermehrten sich die Zellen mit den Medien der pH-Werte 6,6 - 7,0 - 7,4 - 7,5 - 7,8 ohne signifikante Unterschiede; lediglich die Zahl der mit dem Medium vom pH-Wert 8,2 inkubierten Zellen blieb mit etwa 0,5 log unter den erreichten Werten.

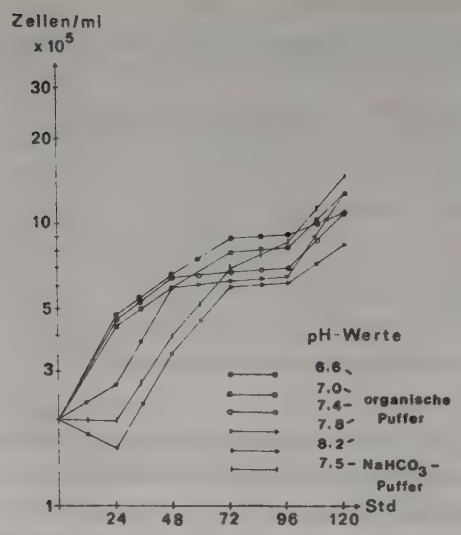

Abb. 15 Forellengonadenzellvermehrung (22°C) mit einem auf verschiedene Ausgangs-pH-Werte eingestelltem Medium (EMEM).

Bemerkenswert ist die zunächst zurückbleibende Vermehrung der mit Medien der pH-Werte 7,5, 7,8 und 8,2 gezüchteten Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Zelleinsaat. Die Ausbildung einer Latenzphase ist vermutlich auf die nach der Zelleinsaat angestiegene Mediumalkalität zurückzuführen.

Im Gegensatz hierzu wiesen die mit Medien von pH-Werten unterhalb 7,5 (7.4, 7.0, 6.6) gezüchteten Zellen auch während der ersten 24 Stunden nach der Zelleinsaat eine exponentielle Vermehrung auf.

2.1.7. Subkulturen

Die Zellen gleichmäßig dichtgewachsener Kulturen wurden zur weiteren Vermehrung subkultiviert.
Um in kurzer Zeit große Zellmengen zu erhalten, erwies es sich als günstig, eine Kulturaufteilung dann vorzunehmen, wenn sich die Zellen in der späten log-Phase befanden. Da

diese Zellen aber ohne Übergang in die stationäre Phase ständig weitervermehrt wurden, konnte meist nur eine befristete Aufteilungsrate (weniger als 10 Subkulturen) erzielt werden.

Für Langzeitkulturen war es dagegen vorteilhafter, die Zellen aufzuteilen, die sich in der stationären Phase befanden. Diese Kulturen wurden langsam etwa in einem 10-14tägigen Rhythmus subkultiviert. Es konnte auf diese Art bis heute eine 12 Monate alte Gonadenzellkultur 36mal, eine 9 Monate alte Herzzellkultur 35mal und eine 11 Monate alte Schwimmblasenzellkultur 35mal subkultiviert werden. Derartige Subkultivierungsraten wurden nur mit physiologisch jungen Ausgangszellen erreicht.

Routinemäßig wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 aufgeteilt. In einigen Fällen konnten bei den besonders vermehrungsfähigen Gonadenzellen juveniler Forellen 1:3 Aufteilungen erfolgreich durchgeführt werden. Höhere Aufteilungsraten erbrachten meistens unbefriedigende Resultate.

Wiesen die Kulturen regressive Veränderungen auf (z.B. Abschwimmen von Zellen), so erholten sich die Zellen nach einer 1:1 Subkultivierung meistens und konnten später wieder begrenzt im Verhältnis 1:2 aufgeteilt werden.
Auffallend war, daß die morphologische Verschiedenartigkeit der Zellen in Primärkulturen mit zunehmender Subkultivierung in eine einheitliche Wuchsform, nämlich in die fibroblastenähnliche, überging.

2.2. Kulturansatz aus Gewebe des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.)

2.2.1. Anzüchtbarkeit verschiedener Gewebearten

Wie bei den Zellkulturen aus Forellengewebe wurde auch hier bei der Auswahl des Anzuchtsmaterials besonders auf die Reproduzierbarkeit der Kulturergebnisse Wert gelegt.

Regelmäßig konnten aus Gonaden- und Schwimmblasengewebe, in einigen Fällen auch aus Herzgewebe, gute Anzuchtsresultate erzielt werden. Im Gegensatz hierzu wuchsen die dispergierten Nierenzellen nur vereinzelt zu lückenhaften und kurzlebigen Kulturen aus. Leber-, Muskel-, Haut-, Flossen- und Kiemengewebe ließen sich in keinem Fall kultivieren.

Die Gonadenzellen noch nicht geschlechtsreifer Karpfen waren in allen Ansätzen vermehrungsfähig. Sie wiesen meistens einen fibroblasten- und epithelartigen (gemischten) Wuchstyp auf (Abb. 16+17).

In Primärkulturen fielen oftmals Oozyten auf, die sich insbesondere durch ihre Größe von den übrigen Zellen unterschieden. Die Anwesenheit derartiger Zellen beeinflußte das Zellwachstum nicht.

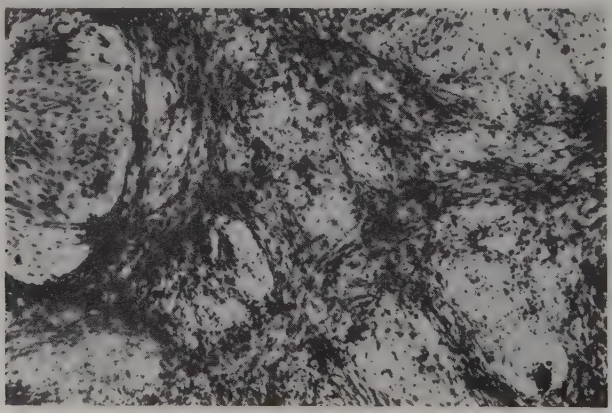

Abb. 16 Primäre Karpfengonadenzellkultur, 28°C, 4 Tage alt, gemischter Zelltyp, HE-Färbung, ca. 60 x.

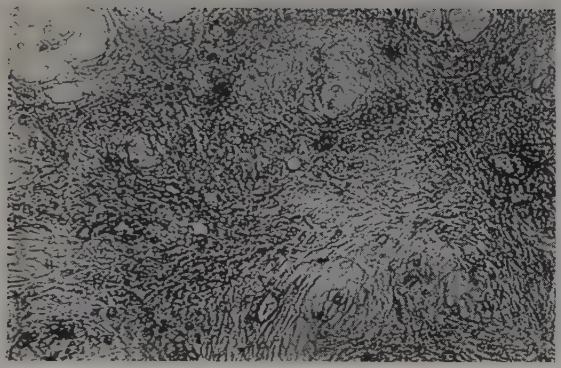

Abb. 17 Primäre Karpfengonadenzellkultur, 28°C, 4 Tage alt, gemischter Zelltyp, nativ, ca. 60 x.

Die kultivierten Schwimmblasenzellen wuchsen mit fibroblastenähnlicher Morphologie (Abb. 18).
In manchen Fällen traten überraschenderweise in Primär- und Subkulturen Riesenzellen auf (Abb. 19). In derartigen Kulturen wuchsen die Zellen außerdem oftmals übereinander. Die Ursache dieser Mehrschichtigkeit sowie das Vorhandensein vielkerniger Riesenzellen ist unklar. Es ist zwar bekannt, daß in Zellkulturen zuweilen neben normalen auch "pathologische" Mitosen auftreten, die zu mehrkernigen Zellen führen können, doch ist das Vorkommen sowie deren Anteil unter den Kulturzellen verhältnismäßig gering.

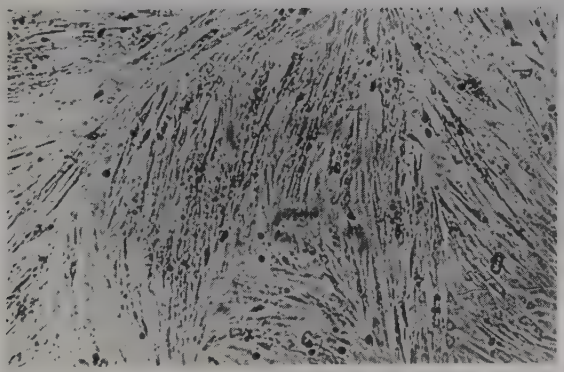

Abb. 18 Primäre Karpfenschwimmblasenzellkultur, 28°C, 4 Tage alt, fibroblastenartiger Zelltyp, nativ, ca. 60 x.

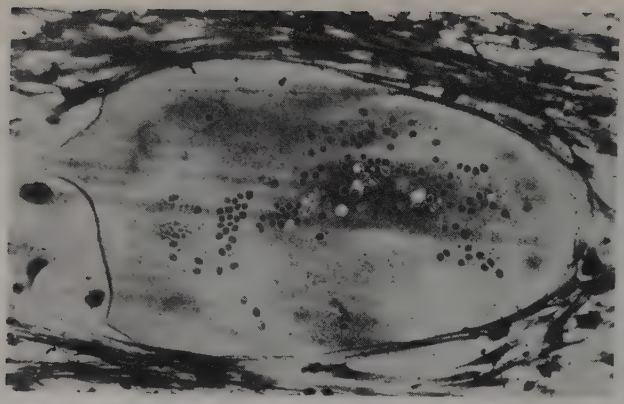

Abb. 19 Mehrkernige Riesenzelle einer primären Karpfenschwimmblasenzellkultur, 28°C, 4 Tage alt, HE-Färbung, ca. 80 x.

Zellen aus Herzgewebe waren nach fraktionierter Abnahme und gründlicher Auswaschung von Blutzellen und Gewebedetritus in einigen Fällen mit 3maliger Vermehrungsrate anzüchtbar. Die Kulturen bestanden regelmäßig aus reinen Fibroblasten (Abb. 20) und waren über etwa zwei Wochen haltbar.

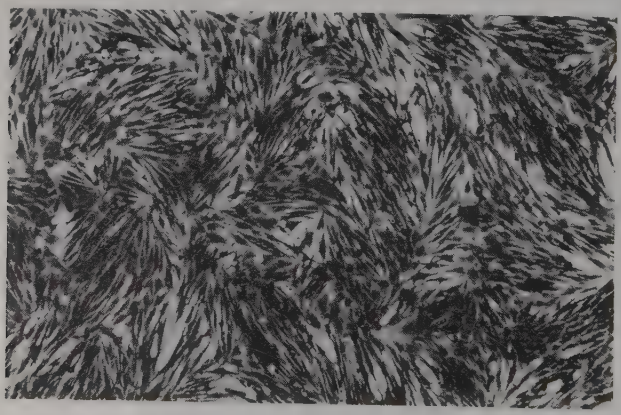

Abb. 20 Primäre Karpfenherzzellkultur, 28°C, 5 Tage alt, fibroblastenartiger Zelltyp, HE-Färbung, ca. 60 x.

Die Zellen aus Karpfennieren setzten sich nur vereinzelt auf der Zuchtunterlage fest. Neben den polymorph aussehenden Zellen traten auch hier wie bei den Schwimmblasenzellkulturen Riesenzellen auf. Ein geschlossener Rasen bildete sich nicht aus; die Zellen hielten sich nur etwa 7 Tage.

Gehirnzellkulturen von fibroblastenähnlichem bis polymorphem Wuchstyp ließen sich nur aus explantierten Gehirnteilen erzielen. Die Kulturen waren etwa 14 Tage lang lebensfähig, ließen sich aber nach Ablösung (STV- bzw. Versenlösung) nicht mehr anzüchten. Auch in diesen Kulturen wurden Riesenzellen beobachtet.

Die Bemühung, standardisierte Zellkulturen aus verschiedenen Karpfengeweben zu erhalten, wurde oftmals - im Gegensatz zu den Kulturen aus Forellengewebe - durch gravierende Unterschiede im Anzuchtserfolg homologer Organe erschwert. Dies lag wahrscheinlich darin begründet, daß für die Versuche Karpfen verschiedenster Herkunft und unterschiedlichstem Allgemeinzustand verwendet werden mußten. Außerdem konnten oftmals in den Anzuchtsorganen verschiedene Bakterienarten (Pseudomonas- und Aeromonasarten) nachgewiesen werden, wodurch nur in einzelnen Fällen steriles Anzuchtsmaterial verfügbar war. Nicht selten traten selbst noch in den Kulturen (bes. bei Nieren und Schwimmblase) Protozoen wie z.B. Cryptobien auf.

2.2.2. Gewebedissoziation

Gonaden- und Schwimmblasengewebe konnte regelmäßig, Herz- und Nierengewebe nur in einigen Fällen mit der verwendeten PBS-T bzw. mit der STV-Lösung bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4 und 33°C in vermehrungsfähige Zellen dispergiert werden. Die enzymatisch aus Leber- Milz, Gehirn, Muskel und Haut freigesetzten Zellen waren meistens nicht mehr lebensfähig.
Kiemen- sowie Flossengewebe konnte mit den angewandten Dispersionsmitteln in keinem Falle in Einzelzellen aufgeschlossen werden.
Allgemein wurde bei der Trypsinierung von Karpfengewebe beobachtet, daß der Aufschluß bei 4°C mit entsprechend langer Dispersionszeit annähernd gleiche Erträge an vermehrungsfähigen

Zellen lieferte, wie der Aufschluß bei 25°C. Wurde dagegen die Gewebedissoziation bei 28°C vorgenommen, so resultierten zwar geringfügig größere Zellmengen, doch schienen die so aufgeschlossenen Zellen schlechter zu wachsen. Eine deutliche Beeinträchtigung der Vermehrung wiesen die bei 33°C dissoziierten Zellen auf. Außerdem nahm mit steigender Aufschlußtemperatur auch der Anteil an toten Zellen zu.

Hinsichtlich der Ausbeute sowie der Vermehrungsfähigkeit der Zellen hat sich das fraktionierte Trypsinierungsverfahren bewährt. Im Gegensatz zum Forellengewebe war es aber notwendig, bei Raumtemperatur mehrere Stunden (4-5) zu trypsinieren, um das Gewebe voll aufzuschließen.

Kältetrypsinierung (etwa 20 Stunden mit zwei Abnahmen) bei 4°C wirkte sich auf das Zellwachstum günstig aus.

Der Gewebeaufschluß mit STV erbrachte gegenüber PBS-T einen um ca. 10-30 % geringeren Zellertrag.

Am Beispiel von Karpfengonaden (Abb. 21) wurde ersichtlich, daß ein fraktionierter Gewebeaufschluß (5 Stunden, stündliche Abnahme) mit PBS-T bei den verschiedenen Temperaturen von 4 - 25 - 28 und 33°C keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellausbeute erbrachte. Die höchste Anzahl an lebenden Zellen wurde bei dem 33°C-Aufschluß mit $5,6 \times 10^7$, die niedrigste bei 4°C mit $2,8 \times 10^7$ Zellen pro Gramm Gewebe erzielt. Während aber alle Fraktionen der Aufschlußtemperaturen von 4 - 25 - 28°C erfolgreich angezüchtet wurden, konnten von dem 33°C-Aufschluß nur die ersten vier Abnahmen mit einigermaßen zufriedenstellendem Erfolg kultiviert werden.

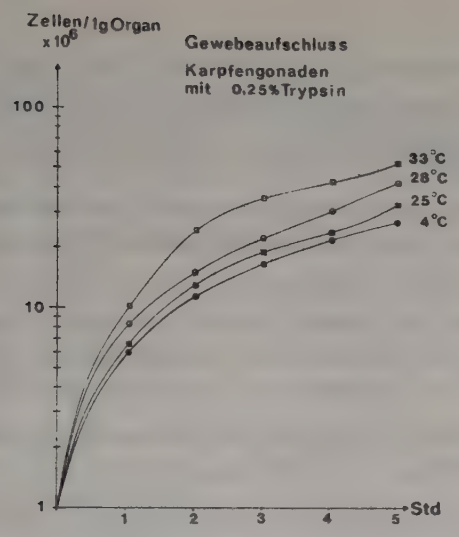

Abb. 21 Gewebeaufschluß von Karpfengonaden mit PBS-T bei verschiedenen Temperaturen. Von dem 33°C-Aufschluß ließen sich nur die Zellen der ersten 4 Fraktionen anzüchten.

Der Anteil an lebensfähigen Zellen war oftmals von Ansatz zu Ansatz hohen Schwankungen ausgesetzt, da vielfach sehr unterschiedliches Anzuchtsmaterial vorlag. Alter, Gewicht und der physiologische Zustand der Zellspender beeinflußten sowohl die Zellausbeute, wie auch den Anzuchtserfolg.
Im Durchschnitt erbrachte ein enzymatischer Aufschluß mit 0,25 %igem Trypsin bei Raumtemperatur aus Gonaden- und Schwimmblasengewebe von K_{1-2} etwa 1-4 x 10^7, aus Herzgewebe etwa 1-3 x 10^6 lebende Zellen pro Fisch. Bei der Verwendung von juvenilem Gewebe (KV), lag der Zellertrag etwa mit einer 10er Potenz unter diesen Werten (Tabelle 11).

Tabelle 11

Durchschnittliche Zellausbeute pro Karpfen verschiedenen Alters aus verschiedenen Gewebearten mit PBS-T bei Raumtemperatur.

Gewebe	Durchschnittliche Ausbeute an lebenden Zellen/Fisch K_{1-2}	KV
Gonaden	$1-5 \times 10^7$	$1-5 \times 10^6$
Schwimmblase	$1-3 \times 10^7$	$1-3 \times 10^6$
Herz	$1-3 \times 10^6$	$2-4 \times 10^5$

In Tabelle 12 ist die durchschnittliche Zellausbeute mit PBS-T bei verschiedenen Temperaturen aus Gonaden-, Schwimmblasen- und Herzgewebe pro 1 Gramm Organ angegeben. Die beste Aufschlußtemperatur scheint für Karpfengewebe 4°C, gefolgt von 25°C zu sein. Wegen zunehmender Zellschädigung sollten trotz der höheren Zellausbeute Temperaturen über 25°C nicht angewandt werden. Längeres Trypsinieren bei 33°C schädigt die Zellen irreversibel.

Tabelle 12

Durchschnittliche Zellausbeute pro 1 Gramm Organ bei verschiedenen Temperaturen mit unterschiedlichem Anzuchtserfolg.

Aufschluß bei °C	Aufschluß in Std.	Abnahmen	Anzuchtserfolg	Durchschnittliche Ausbeute an lebenden Zellen/1 Gramm Organ (K_{1-2}) Gonaden	Schwimmblasen	Herz
4	20	2	sehr gut	2×10^7	1×10^7	2×10^7
25	4	4	gut-sehr gut	1×10^7	7×10^6	5×10^7
28	4	4	gut	3×10^7	7×10^7	-
33	4	4	mäßig	4×10^7	-	-

Gonadengewebe ließ sich nur im unreifen Zustand regelmäßig mit guter Ausbeute an lebensfähigen Zellen dispergieren. Die Organe geschlechtsreifer Tiere wiesen meistens eine schwammige Konsistenz auf; in diesen Fällen wurde eine Vortrypsinierung, d.h. Verwerfen der ersten 1-2 Fraktionen notwendig, da der Anteil an toten Zellen sowie Zelldetritus sehr hoch war.

Beim Aufschließen von Schwimmblasengewebe fiel in den Zellsuspensionen öfters die große Menge des aus dem Bindegewebe stammenden, nadelförmigen Ichthyokolls auf. Das Kulturwachstum schien aber durch dessen Anwesenheit nicht beeinträchtigt.

Aus Herzgewebe resultierten in den Zellsuspensionen regelmäßig Fettkugeln, Bindegewebsfasern und Blutzellen, welche das Zellwachstum negativ beeinflußten.

Nierengewebe lieferte in den ersten Fraktionen nur tote Zellen, Zelldetritus und Blutzellen. Nur die 3. bzw. die 4. Abnahme des bei Raumtemperatur aufgeschlossenen Gewebes enthielt durchschnittlich $1x10^7$ lebende Zellen/Gramm Gewebe, von denen sich aber nur etwa 40% als vermehrungsfähig erwiesen.

2.2.3. Zelleinsaatmenge

Gewöhnlich wurde bei Karpfenzellkulturen eine höhere Zelleinsaatmenge als bei Kulturen aus Forellengewebe benötigt. Gonadenzellen wuchsen mit einer Initialeinsaat von $2x10^6$ Zellen/ml Medium bei 28°C innerhalb von ca. 48 Stunden zu einem dichten Zellrasen aus; wurden dagegen $8x10^4$ Zellen/ml eingesät, so bildete sich erst nach mehr als 168 Stunden eine dichte Zellschicht (Abb. 22). Bei weniger als $8x10^4$ eingesäten Zellen/ml resultierten meist nur Zellinseln, die in den wenigsten Fällen einen dichten Rasen ergaben.

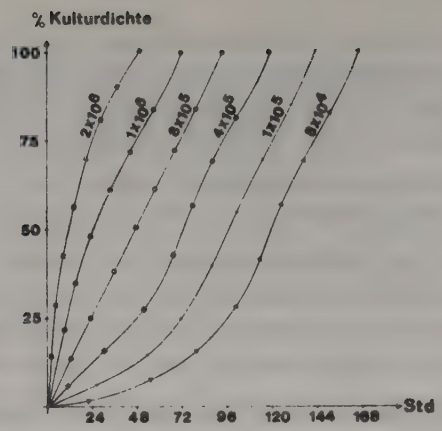

Abb. 22 Karpfengonadenzellwachstum bei 28°C in Abhängigkeit von der Zelleinsaatmenge

Um innerhalb 72-96 Stunden nach der Zelleinsaat dichte Kulturen zu erhalten, wurden durchschnittlich folgende Zellkonzentrationen ermittelt:

Gonadenzellen	$6-8 \times 10^5$ Zellen/ml
Schwimmblasenzellen	$8-10 \times 10^5$ Zellen/ml
Herzzellen	$8-10 \times 10^5$ Zellen/ml
Nierenzellen	$1-2 \times 10^6$ Zellen/ml

Jugendliches schonend aufgeschlossenes Ausgangsmaterial ($KV-K_1$) lieferte gewöhnlich bei geringerer Zelleinsaatmenge in kürzerer Zeit dichtere Kulturen als das Gewebe von älteren Fischen (K_3). Die biologische Beschaffenheit der aufgeschlossenen Zellen schien auch hier von Spender zu Spender zu variieren.

2.2.4. Zellwachstum bei verschiedenen Temperaturen

Die Zellen aus Karpfengewebe wuchsen gut bei den Temperaturen zwischen 22 bis 33°C; die beste Wachstumsrate lag etwa bei 28°C (Abb. 23).

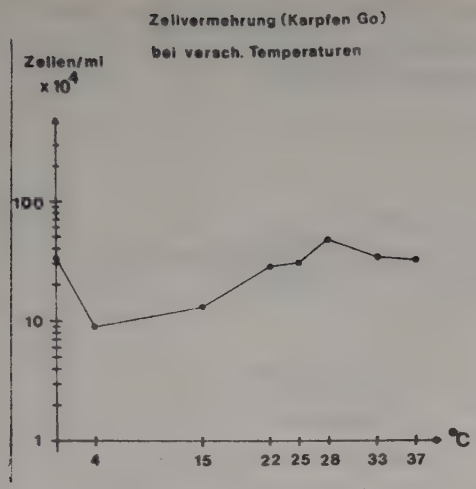

Abb. 23 Vermehrung von Karpfengonadenzellen bei verschiedenen Temperaturen während einer 62stündigen Inkubationsdauer

Wurden die Kulturen bei Temperaturen unterhalb 22°C (bis 15°) inkubiert, so verzögerte sich die Wachstumsgeschwindigkeit um ca. 20-30 %. Bei den Temperaturen zwischen 4 und 15°C war die Wachstumsrate um ca. 40-60 % verringert und die Zellen neigten teilweise zur Aggregatbildung. 37°C schien für die Zellvermehrung die oberste Grenze zu sein; die Zellen wuchsen zwar mit einer gegenüber 33°C etwas geringeren Vermehrungsrate, es lösten sich aber teilweise bereits nach 24 Stunden Einzelzellen ab. Bei längerer Bebrütung (3-7 Tage) degenerierten die Zellen und die Kultur verlor rasch an Dichte.
Allgemein vertrugen die Zellen unter der Optimaltemperatur liegende Temperaturen besser als darüberliegende.

2.2.5. Zellvermehrung mit verschiedenen Medien

Mit den halbsynthetischen Medien

TC 199 (=Medium 199 + 20 % KS)
L_{15} (=Leibovitz-Medium + 10 % KS)
EMEM (=Earle-MEM + 10 % KS + 0,5 % LA)
HMEM (=Hanks-MEM + 10 % KS + 0,5 % LA)

vermehrten sich die Karpfenzellen gut und ohne signifikanten Unterschiede. Am besten wuchsen die Kulturen mit L_{15}, gefolgt von HMEM, TC 199 und EMEM (Abb. 24).

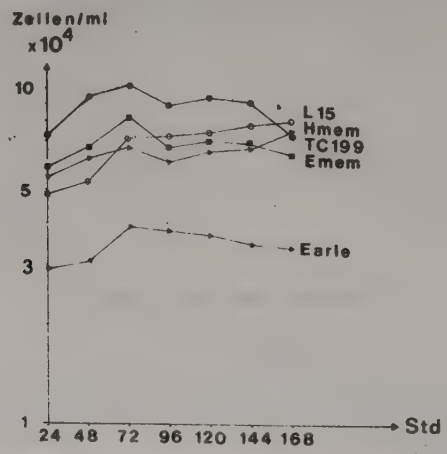

Abb. 24 Wachstumskurven von Gonadenzellen des Karpfens mit verschiedenen Zellkulturmedien bei 28°C.

Das Zellwachstum mit Earle (=Earle's Salzlösung + 10 % KS + 0,5 % LA) blieb etwa 30 % unter den mit den anderen Medien erzielten Werten, was vermutlich auch hier auf ein unzureichendes Nährstoffangebot zurückzuführen ist.
Die mit den verschiedenen Medien gezüchteten Zellen wiesen teilweise morphologische Unterschiede auf.

Während bei den Medien TC 199, L_{15} und HMEM die Zellen epithel- und fibroblastenähnlich auswuchsen, bestanden die mit EMEM und Earle gezüchteten Kulturen teilweise auch aus polygonalen Zellen.

Von den verwendeten biologischen Mediumzusätzen erwies sich Kälberserum in 5-15 %iger Konzentration als bester Wachstumsstimulus. Dabei schien fötales Kälberserum dem vorgetesteten normalen Kälberserum hinsichtlich des Wachstumseffektes nicht überlegen zu sein, wie aus Abb. 25 hervorgeht.

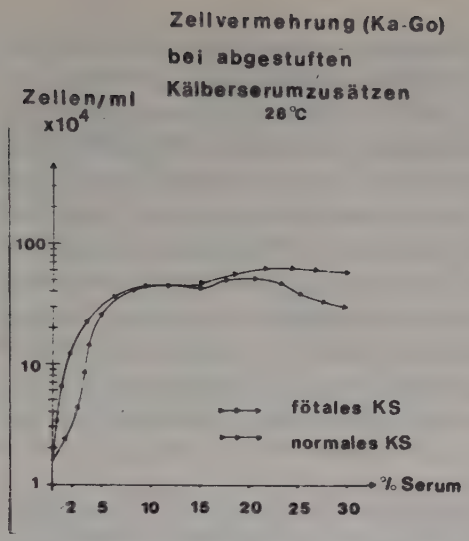

Abb. 25 Wachstumskurven von Gonadenzellen des Karpfens mit unterschiedlich hohen Kälberserumanteilen (KS) im Medium.

Obere Kurve: Fötales KS
Untere Kurve: Normales KS

Fischserum aus Blut homologer oder heterologer Arten in 10 %iger Konzentration dem Medium zugesetzt, wirkte sich auf das Zellwachstum nachteilig aus. Die Kulturen wuchsen schlechter, teilweise granuliert und vakuolisiert, als mit Kälberserum.

Laktalbumin in 0,5 %iger Konzentration im Medium schien für die Karpfenzellen ohne besonderen Effekt zu sein, da Kulturen ohne Laktalbuminzusatz kein unterschiedliches Wachstumsverhalten aufwiesen.

In nährstoffarmen Medien (Erhaltungsmedien, alte Anzuchtsmedien) konnten die Kulturen aus Schwimmblasen-, Gonaden- und Herzgewebe ohne Mediumwechsel bei Temperaturen von 22-25°C bis zu 4 Wochen in gutem Zustand gehalten werden.

2.2.6. Subkulturen

Im Gegensatz zu den Zellkulturen aus Forellengewebe konnten die Karpfenzellen allgemein nur begrenzt (3-6x) subkultiviert werden.

Dichtgewachsene Primärkulturen aus Gonadengewebe ließen sich maximal siebenmal, Schwimmblasenzellkulturen sechsmal und Herzzellen dreimal mit einer 1:2 Aufteilung subkultivieren. Die Zellen aus Nierengewebe konnten mit einer 1:1 Aufteilung nicht über die 2. Subkultur hinaus in einem vermehrungsfähigen Zustand gehalten werden. Auch ließen sich aus Gehirnexplantaten ausgewachsene Zellen in keinem Falle subkultivieren. Der günstigste Zeitpunkt für eine Subkultur schien bei Zellen aus Karpfengewebe die späte Vermehrungsphase zu sein. Wurden dichtgewachsene Kulturen, die sich bereits längere Zeit (etwa 10 Tage) in der stationären Phase befanden, subkultiviert, so degenerierten die Zellen in vielen Fällen nach der zweiten 1:2 Aufteilung.

Supraoptimale Inkubationstemperaturen (22-25°C) wirkten sich auf Zellvermehrungsfähigkeit und Teilungsrate wesentlich günstiger aus als höhere Temperaturen (28°C und darüber).

2.3. Rezept für die routinemäßige Herstellung von primären Zellkulturen aus Forellen- und Karpfengewebe

Für das virologische Arbeiten eignen sich besonders Schwimmblasen- und Gonadenzellen, da diese regelmäßig zu dichten Einschichtzellkulturen auswachsen. Allgemein kann das Anzuchtsergebnis von Ansatz zu Ansatz und von Spender zu Spender variieren. Diese biologischen Schwankungen wirken sich auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwerend aus.

Nachstehend wird die Herstellung von Primärkulturen beschrieben:

Technik: Instrumente: Pinzetten verschiedener Größen, Scheren, Skalpell, Magnetrührer mit Rührstab, Zählkammer.

Glaswaren: Große und kleine Petrischalen, Erlenmeyerkolben 100-500 ml, Zentrifugengläser, Pipetten 5 und 10 ml, Anzuchtsgefäße, Mullfilter.

Materialien: Gonaden und Schwimmblasen der entsprechenden Tierart, PBS-, PBS-T-Lösung; Earle's- oder Hanks'-Salzlösung, Eagle's Minimal Essential Medium, Medium 199 oder Leibovitz (L_{15})-Medium; Kälberserum, Laktalbuminlösung 5 %ig, Phenolrotlösung 0,1 %ig

Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Polymyxin, Neomycin, Mycostatin), Trypanblaulösung 2 %ig, Alkohol 75 %ig.

Die Organe werden im Zellzuchtlaboratorium nach Oberflächensterilisation (70 %iger Alkohol) der Schnittstelle unter sterilen Bedingungen entnommen, in einer antibiotikahaltigen PBS-Lösung dreimal gewaschen, mit einer Schere in ca. 1-2 mm^3 große Stücke zerkleinert und erneut dreimal in PBS gewaschen. Für einen sterilen Ansatz ist es meistens vorteilhaft, die gewaschenen Organstückchen in frischer antibiotikahaltiger PBS-Lösung für 4 Stunden bei 4°C zu belassen. Anschließend wird das Anzuchtsmaterial in einen Erlenmeyerkolben überführt, mit 25 ml PBS-T-Lösung pro Gramm Gewebe überschichtet und auf einem Magnetrührer (100-200 U/m) entweder bei 4°C 10 bis 20 Stunden mit zwei Abnahmen oder bei 25°C (Forellengewebe) bzw. 25-28°C (Karpfengewebe) 240 Minuten mit stündlicher Abnahme aufgeschlossen.
Die einzelnen Fraktionen können anschließend sofort angezüchtet oder bei 4°C (nach Zugabe von 10 % Kälberserum zur Trypsininaktivierung) für einen gemeinsamen Ansatz gesammelt werden.

Nach Entnahme der Fraktion und Ergänzung auf das ursprüngliche Volumen mit frischer PBS-T-Lösung, wird die Zellsuspension durch ein 4-6faches steriles Mullfilter gegeben und anschliessend zentrifugiert (450xg, 5 Min.). Das Sediment wird dann in PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert (450xg, 5 Min.). Darauf erfolgt die Zellaufnahme im Anzuchtsmedium (1:10-1:100) und die Zellzählung.

Die auf eine gewünschte Zellkonzentration ($2-8x10^5$ Z/ml) eingestellte Medium-Zellsuspension wird schließlich in die Zuchtgefäße eingefüllt und inkubiert. Die Inkubationstemperatur beträgt bei Kulturen aus Forellengewebe 20-22°C und bei Kulturen aus Karpfengewebe 25-28°C. Die Zellen wachsen durchschnittlich in 48-72 Stunden ohne Mediumwechsel zu einem dichten Rasen aus.

Zur Zellanzucht können für das Gewebe beider Fischarten folgende Medien verwendet werden:

Earle's- oder Hanks'-Salzlösung mit 10 % KS, 10 % Laktalbuminhydrolysat (5 %ig), 4 % MEM-Konzentrat, 1 % Phenolrotlösung (0,1 %ig),

Antibiotika:	Penicillin	100 I.E. pro ml	Medium
	Streptomycin	100 Gamma	"
	Polymyxin	50 Gamma	"
	Neomycin	50 Gamma	"
	Mycostatin	50 I.E.	"

oder

Medium 199 mit 10-20 % KS, 1 % Phenolrotlösung (0,1 %ig), Antibiotika: w.o.

oder

Leibovitz Medium (L_{15}) mit 10 % KS, 1 % Phenolrotlösung (0,1 %ig), Antibiotika: w.o.

2.4. Zellkulturen aus dem Gewebe von bei 4°C gelagerten Fischen

Von den post mortem bei 4°C aufbewahrten Fischen waren die Schwimmblasen- und Gonadenzellen auch nach einer 48stündigen Lagerung noch vermehrungsfähig. Eine längere Aufbewahrung lieferte dagegen negative Anzuchtsergebnisse.

2.5. Zellkulturen aus bei -70°C konserviertem Gewebe

Der enzymatische Zellaufschluß des bei -70°C eingefrorenen Forellen- und Karpfengewebes erbrachte unterschiedliche Ergebnisse.
Während die Gonaden und Schwimmblasen von Forellen bis zu 25 % überlebende und anzuchtsfähige Zellen lieferten, waren die Karpfenzellen in keinem Falle mehr lebensfähig.

Die aus dem tiefgefrorenen Forellengewebe dispergierten Zellen setzten sich, Zellinseln ausbildend, auf der Zuchtunterlage fest und wuchsen mit fibroblastenartiger Morphologie innerhalb von 14 Tagen bei dreimaligem Mediumwechsel zu einem dichten Rasen aus. In 14tägigem Rhythmus konnten maximal drei Subkulturen mit einer 1:1 bis 1:2 Aufteilung erzielt werden.

2.6. Lagerung und Konservierung von Zellen

2.6.1. Lagerung von suspendierten Zellen und Einschichtzellkulturen

2.6.1.1. Bei Zuchttemperatur

Bei Zuchttemperatur (20-22°) konnten dichte Zellkulturen aus Gonaden-, Schwimmblasen- und Herzgewebe der Regenbogenforelle mit Erhaltungsmedium bis zu etwa 45 Tagen in gutem Zustand gehalten werden. Kulturen aus Karpfengewebe (Schwimmblasen, Gonaden, Herz) hielten sich dagegen bei 25°C in der Regel nicht länger als 14 Tage.

2.6.1.2. Bei 4°C

Durch Lagerung bei 4°C blieben Zellkulturen aus Forellengewebe (Gonaden, Schwimmblase, Herz) ohne Mediumwechsel bis zu 120 Tagen lebens- und vermehrungsfähig. Die Zellen ließen sich danach regelmäßig mit einer 1:2 Aufteilung subkultivieren.

Karpfenzellen hielten sich dagegen bei 4°C nur 3-4 Wochen in einem guten Zustand; danach verlor der Zellrasen durch Abschwimmen von Zellen an Dichte. Es gelang nur in einigen Fällen die erfolgreiche 1:1 Subkultivierung.

Von den in Reagenzgläsern 60 Tage lang bei 4°C gelagerten suspendierten Forellengonadenzellen hatte sich nur ein geringer Anteil an der Glaswand festgesetzt. Nach Abschütteln ließen sich die Zellen erneut anzüchten. Die Zellverlustquote betrug ca. 30 %.

2.6.2. Einfrieren von Zellen

Die mittels der Tiefgefriermethode bei -70°C konservierten Zellen erbrachten hinsichtlich der Überlebensfähigkeit stets unbefriedigende Resultate. Nach einer drei Wochen dauernden Lagerung waren von den Forellengonadenzellen lediglich 6,3 %, von den Forellenschwimmblasenzellen nur 2 % und von den Karpfengonaden- und Schwimmblasenzellen dagegen 0 % überlebensfähig.

In keinem Falle wurde von den in verschiedenen Konzentrationen ($2x10^4$, $7x10^4$, $1x10^5$, $2x10^5$ Z/ml) eingesäten Zellen eine

10 %ige Kulturdichte erreicht.

2.7. Züchtung und Haltung von Zell-Linien

Die Zellen der RTG-2-Zell-Linie (84.-110. Subkultur) wuchsen am besten mit einem Medium, bestehend aus 74 % Hanks' Salzlösung, 10 % fötalem Kälberserum, 10 % Laktalbumin (5 %ig), 4 % MEM-Konzentrat (s.S. 38), 1 % NEA-Konzentrat (s.S. 38/39), 1 % Phenolrot (0,1 %ig) + Antibiotikazusatz (s.S. 37/39). Zur Zellerhaltung dichter Kulturen wurde der Serumanteil auf 3 % reduziert.
Gewöhnlich wuchsen die Zellen mit einer Einsaatmenge von $5-8 \times 10^4$ Z/ml bei 20-22°C in 3-5 Tagen zu dichten Kulturen aus. Der Wuchstyp war einheitlich fibroblastoid (Abb. 26). Regelmäßig wurden die Zellen einmal wöchentlich im Verhältnis 1:2 - 1:3 aufgeteilt. Mit einer Einsaatmenge von 5×10^4 Zellen/ml blieben die Kulturen bei 4°C über 120 Tage ohne Mediumwechsel in gutem Zustand und vermehrten sich unter Normalbedingungen wieder fortlaufend.

Die Tiefgefrierkonservierung bei -70° erbrachte nach 4 Wochen nur 12 % überlebende Zellen, welche in entsprechend hoher Neueinsaatmenge ($1-2 \times 10^6$ Z/ml) wieder anzüchtbar waren.

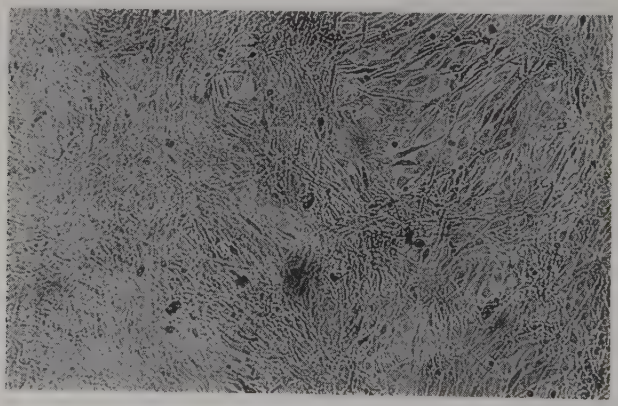

Abb. 26 Zellen der RTG-2-Zell-Linie, 22°C, 3 Tage alt, 95. Subkultur, fibroblastenartiger Zelltyp, nativ, ca. 60 x

Die Zellen der FHM-Zell-Linie (209.-239. Subk.) wurden mit gutem Erfolg mit EMEM (s.S. 40) gezüchtet. Eine Verwendung von fötalem Kälberserum im Medium erwies sich dabei als unerläßlich, da die Kulturen unter normalem Kälberserumzusatz nach der 1.-2. Subkultur degenerierten. Die reinen Epithelzellen (Abb. 27) wuchsen bei Raumtemperatur und 28°C, tolerierten aber auch 30-33°C. Mit einer Einsaatmenge von $8-10 \times 10^4$ Zellen/ml wurden in etwa 72 Stunden dichte Kulturen erzielt, welche wöchentlich 1:2-1:3 aufgeteilt werden konnten. Dichte Zellkulturen hielten sich bei 25°C maximal fünf Wochen ohne zwischenzeitlichen Mediumwechsel. Wurden die Kulturen bei 4°C gelagert, so kugelten sich die Zellen ab, aggregierten und vermehrten sich erst wieder bei Zuchttemperatur.

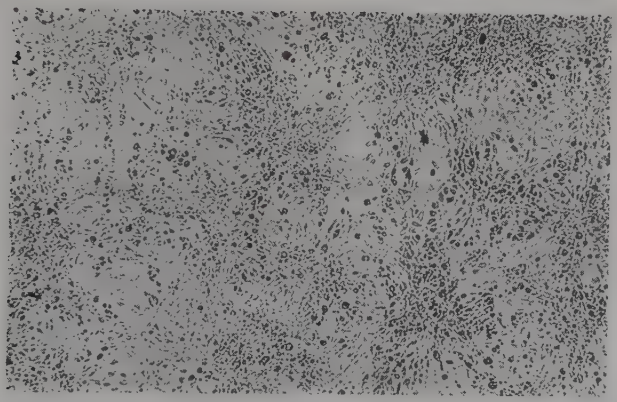

Abb. 27 Zellen der FHM-Zell-Linie, 25°C, 3 Tage alt, 225. Subkultur, epithelartiger Zelltyp, nativ, ca. 60 x

2.8. Chromosomendarstellung

Bei diesen Untersuchungen stand die Erarbeitung einer einfachen Technik zur Darstellung von Fischchromosomen im Vordergrund, da die Durchführung der bisher beschriebenen Methoden relativ schwierig und aufwendig ist.

Mit dem angewandten Verfahren ließen sich die Metaphasechromosomen i n v i t r o kultivierter Fischzellen darstellen.

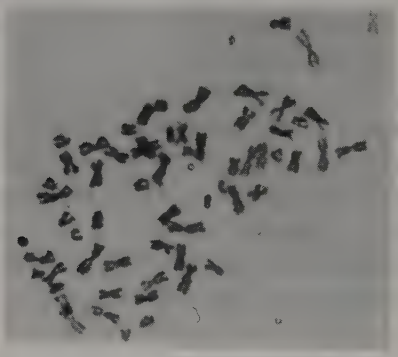

Abb. 28 Metaphase-Chromosomen von Forellengonadenzellen, 7. Subkultur, Orcein-Färbung, ca. 1500 x

Die Ausbeute an Mitosechromosomen war jeweils groß genug, um Chromosomenzählungen vornehmen zu können. Während bei einer 6 Monate alten und siebenmal aufgeteilten Forellengonadenzellkultur die Chromosomenzahlen zwischen 50 und 65 pro Zelle mit einer mittleren Häufigkeit von 63 ± 2 lagen, wurden in Zellen der RTG-2-Zell-Linie 40-67, aber oftmals auch mehr (in einigen Fällen über 100) Chromosomen ermittelt. WOLF und QUIMBY (1962) fanden dagegen bei RTG-2-Zellen 49 bis 71 (59 ± 2) Chromosomen pro Zelle. Diese Fluktuation der Chromosomenzahlen muß vermutlich mit den noch nicht geklärten Problemen der Zell-Kulturalteration in Zusammenhang gebracht werden.
Nach einer Zusammenstellung von POST (1965) überwiegt innerhalb der meisten Teleosteergruppen die haploide Chromosomenzahl 24. Diese Zahl scheint demnach für die Teleosteer von ancestraler Bedeutung zu sein. Bei einigen Familien wie z.B. bei den Salmoniden, können jedoch die Chromosomenzahlen oftmals erheblich variieren.
Für die Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) wird die diploide Chromosomenzahl 60 angegeben (WOLF und QUIMBY, 1962).

Von den Chromosomen der 6 Monate alten, siebenmal subkultivierten Forellengonadenzellkultur (♀), die eine größte Übereinstimmung in ihrer Anzahlhäufigkeit (63 Chromosomen) aufwiesen, wurde ein Karyogramm angefertigt (Abb. 29).

Abb. 29 Karyogramm einer i n v i t r o siebenmal subkultivierten Forellengonadenzelle, (♀) n - 63

C Besprechung der Ergebnisse

Bei der Herstellung von Fischzellkulturen muß wegen der biologischen Verschiedenartigkeit der Gewebe grundsätzlich zwischen Süß- und Salzwasserfischen unterschieden werden. Auch der Klassen- oder Familienzugehörigkeit der Zellspender ist durch Modifizierungen der beschriebenen Standardmethoden oftmals Rechnung zu tragen.

Die hier beschriebenen Untersuchungen können mit gewissen Einschränkungen als repräsentativ für Zellkulturen aus Süßwasserteleosteergewebe spez. für Salmoniden und Cypriniden angesehen werden.

Es ließ sich regelmäßig mit brauchbaren Resultaten für das virologische Arbeiten Gonaden-, Schwimmblasen- und embryonales Gewebe, teilweise auch Herzgewebe von Forellen und Karpfen, i n v i t r o kultivieren.
Die von verschiedenen Autoren (GRÜTZNER, 1958; WOLF et al., 1960; CLEM et al., 1961; KUNST, 1962, u.a.) erzielten positiven Anzuchtsergebnisse mit Leber-, Nieren-, Milz-, Flossen- oder anderem Gewebe konnten nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu GRÜTZNER (1958), BABINI und GHITTINO (1961) u.a., aber in Übereinstimmung mit den meisten anderen Autoren (JENSEN, 1963; ROBERTS, 1964; LI und STEWART, 1965; GRAVELL und MALSBERGER, 1965; WOLF und QUIMBY, 1969 b; u.a.), wurde das Gewebe mit einer 0,25 %igen Trypsin-PBS- bzw. STV (Saline-Trypsin-Versen)-Lösung, welche in der Osmolarität den Mammaliermedien entsprach, erfolgreich aufgeschlossen.

Obwohl mit der STV-Lösung gegenüber dem Gewebeaufschluß mit 0,25 %igem Trypsin etwa um 20-30 % geringere Zellerträge erzielt wurden, ist die besondere Wachstumsfreudigkeit der mit STV dispergierten Zellen bemerkenswert. MONTES de OCA et al. (1971) machten bei Säugerzellen ähnliche Beobachtungen.

Nach den vorliegenden Untersuchungen soll Süßwasserteleosteergewebe allgemein nicht bei Temperaturen über 25°C trypsiniert werden. Darunter liegende Werte beeinflussen die Lebensfähig-

keit der dispergierten Zellen positiv. Forellenzellen werden bei einer Aufschlußtemperatur von 28°C, Karpfenzellen bei 33°C irreversibel geschädigt. WOLF und QUIMBY (1969 b) berichten über ähnliche Erfahrungen.

Im Gegensatz zu Berichten von PFITZNER und GRÜTZNER (1964) lieferte der Gewebeaufschluß bei 4°C über Nacht sehr gute Resultate hinsichtlich der Ausbeute an vermehrungsfähigen Zellen. Während eines 20stündigen Trypsinierungsvorganges wurden annähernd gleiche Zellmengen dispergiert, wie sie aus einem 2-3stündigen Gewebeaufschluß bei Raumtemperatur resultierten. Entsprechend lange (10-20 Stunden) Trypsinierungszeiten bei 4°C brachten bessere Resultate als eine kürzere Aufschlußdauer, wodurch die von KUNST und FIJAN (1966) gemachten Erfahrungen bestätigt wurden. Trypsinierungszeiten bei Raumtemperatur über 2-3 Stunden hinaus schienen sich allgemein auf die Höhe des Zellertrages nicht signifikant auszuwirken. Bewährt hat sich das fraktionierte Dispersionsverfahren mit einzelnen Abnahmen in bestimmten Zeitintervallen (im 1/2-1stündigen Rhythmus bei 25°C oder 2x8-10stündig bei 4°C).

Aus den Untersuchungen kann allgemein gefolgert werden, daß eine Langzeittrypsinierung (10-20 Stunden) bei 4°C für Süßwasserteleosteergewebe das schonendste Aufschlußverfahren darstellt.

Aus einer Speiseforelle (1-2jährig) konnten durchschnittlich mit 0,25 %igem Trypsin bei Raumtemperatur $1-5 \times 10^7$ Gonaden-, $8-10 \times 10^6$ Schwimmblasen- und $2-4 \times 10^6$ Herzzellen gewonnen werden. Das Gewebe eines Karpfens (K_{1-2}) lieferte dagegen unter gleichen Bedingungen $1-5 \times 10^7$ Gonaden-, $1-3 \times 10^7$ Schwimmblasen- und $1-3 \times 10^6$ Herzzellen. Bei Verwendung von Gewebe jugendlicher Fische reduzierte sich die Zellausbeute um ca. eine 10er Potenz.

Die Zellen aus Forellengewebe wuchsen regelmäßig mit einer Einsaatmenge von $2-4 \times 10^5$ (Gonaden), $8-10 \times 10^5$ (Schwimmblase) und $6-8 \times 10^5$ Z/ml (Herz) in 72 Stunden zu dichten Kulturen aus. Bei Karpfenzellen mußten $6-8 \times 10^5$ (Gonaden), $8-10 \times 10^5$ (Schwimmblase) und $8-10 \times 10^5$ Z/ml (Herz) eingesät werden. Mit der

Einsaat von höheren Zellkonzentrationen, wie sie von verschiedenen Autoren (GRÜTZNER, 1958; FRYER et al., 1965; u.a.) als notwendig erachtet werden, wuchsen die Kulturen zwar schneller dicht, doch waren diese für virologisches Arbeiten ungeeignet, da sich oftmals bereits 24-48 Stunden nach der Einsaat der gesamte Zellrasen abzulösen begann. Die Zellen jugendlicher Fische wiesen besonders hohe Vermehrungsraten auf.

Für die Fischzellzüchtung wurden die halbsynthetischen Mammalierzellkulturmedien (TC 199, L_{15}, HMEM, EMEM, s.S. 40) erfolgreich angewandt, die im Gegensatz zu Arbeiten verschiedener Autoren (GRÜTZNER, 1958; u.a.) nicht isotonisch verdünnt waren. Bei den verwendeten Nährmedien sind hinsichtlich der Zellvermehrungsrate keine signifikanten Unterschiede beobachtet worden. Lediglich das als "Earle" bezeichnete Medium (Salzlösung nach EARLE + 10 % KS + 0,5 % LA) scheint vermutlich wegen des zu geringen Nährstoffangebotes für das Wachstum von Süßwasserteleosteerzellen ungeeignet zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auf Grund empirischer Untersuchungen WOLF und DUNBAR (1957, 1958), PFITZNER und GRÜTZNER (1964), GRAVELL und MALSBERGER (1965); LI und STEWART (1965); LI und JORDAN (1969); PLUMP und WOLF (1971); u.a.

Als biologischer Mediumzusatz hat sich Kälberserum, vornehmlich fötales Kälberserum in 5-20 %iger Konzentration bewährt.

Im Gegensatz zu Berichten von BABINI und GHITTINO (1961), KUNST (1961, 1962), TOMASEC et al. (1964), u.a., aber in Übereinstimmung mit GRÜTZNER (1956 a), CLEM et al. (1961), FRYER et al. (1965), war in keinem Fall homologes oder heterologes Fischserum dem Kälberserum als Zellwachstumsstimulus überlegen.

Eiultrafiltrat in 5-10 %iger Konzentration im Medium zeigte bei Zellen, die sich in der Degenerationsphase befanden, regenerative Wirkungen; WOLF und QUIMBY (1969 b) hatten bei verschiedenen Zell-Linien ähnliche Effekte beobachtet. Für Süßwasserteleosteerzellen erscheint die Verwendung weiterer Mediumadditiva wegen unerwiesener nutritiver Effekte

(z.B. Laktalbumin) oder infolge der schwierigen Beschaffung (z.B. humane Aszitesflüssigkeit) wenig sinnvoll.

Der pH-Wert der Kulturmedien erwies sich für das Zellwachstum als kein kritischer Faktor. Im allgemeinen vermehrten sich die Zellen ohne signifikante Unterschiede in einem pH-Bereich von 6,6 - 7,9. Das pH der meisten gebräuchlichen Medien liegt innerhalb dieser Grenzen. Primärzellen wuchsen besser bei Werten um pH 7,5. LI und JORDAN (1969) kommen in ihren Untersuchungen über die pH-Anforderungen von kultivierten Fischzellen zu ähnlichen Ergebnissen. Ergänzend hierzu wurde festgestellt, daß Forellengonadenzellen, die mit Medien der pH-Werte über 7,5 gezüchtet worden waren, sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Einsaat nicht merklich vermehrten. Dagegen stieg aber die Zellvermehrung auch während dieser Zeit exponentiell an, wenn das Medien pH in einem Bereich zwischen 6,6 - 7,5 lag.

Die Forellenzellen wuchsen in einem Temperaturbereich zwischen 4 und 25°C. Bei 20-22°C wurden die höchsten Zellvermehrungsraten ermittelt. Während bei 4°C die Intensität des Zellwachstums um ca. 50-70 % gegenüber der Optimaltemperatur reduziert war, wuchsen die Zellen bei 25°C zwar in gleicher Zeit als bei 20-22°C dicht, wiesen aber bereits 24 Stunden nach dem Dichtwachsen degenerative Veränderungen auf. 28°C wurde von den Zellen nicht mehr toleriert. LI und JORDAN (1969) beschrieben für Forellengonadenzellen gleich gutes Wachstum zwischen 18 und 23°C und gaben ebenfalls 28°C als nicht mehr tolerierbare Temperaturgrenze an. PLUMB und WOLF (1971) ermittelten für die RTG-2-Zellen beste Wachstumsraten bei 20°C; die Zellverdoppelungszeit lag bei dieser Temperatur bei zwei Tagen.

Karpfenzellen vermehrten sich gut in einem Temperaturbereich zwischen 22 und 33°C, mit der besten Wachstumsrate bei 28°C. Bei den Temperaturen zwischen 4-15°C reduzierte sich die Zellvermehrung um ca. 40-60 %. 37°C wurde von den Zellen nur für kurze Zeit überlebt.

Zellwuchstypveränderungen infolge Temperaturunterschiede mit Übergängen von einer Epithel- (22°C) über eine Misch- (22-26°C)

zu einer Fibroblastenkultur (26°C), wie sie von PFITZNER und GRÜTZNER (1964) beschrieben wurden, sind nicht beobachtet worden.

Die von WOLF und QUIMBY (1969 b) gemachten Erfahrungen, daß verschiedene Fischzellen über mehrere Monate ohne Mediumwechsel bei 4°C in einem lebensfähigen Zustand bleiben, konnte nur hinsichtlich der Forellenzellen, die sich bis zu 120 Tagen hielten, bestätigt werden; Karpfenzellen dagegen degenerierten bei dieser Temperatur bereits nach 3-4 Wochen.

Das Anzuchtsergebnis der mit DMSO-haltigen Medien bei -70°C konservierten primären oder subkultivierten Zellen beider Fischarten verlief stets negativ. Die Überlebensrate betrug maximal 6,3 %. Auch der geringe Prozentsatz (12 %) an überlebenden RTG-2-Zellen unterschied sich von den Ergebnissen anderer Autoren (WOLF und QUIMBY, 1969 b).

Die Fischzellen wurden wie die Mammalierzellen, bei denen meist die Einfrierrate keine wesentliche Rolle spielt, relativ schnell bis -70°C eingefroren. Es scheint aber, daß wegen der geringen Überlebensquote die Einfriergeschwindigkeit für Fischzellen von Bedeutung ist.

Im Gegensatz hierzu waren die Überlebenschancen der Zellen größer (25 %), wenn 1-3 mm^3 große Gonaden- oder Schwimmblasenstücke im ganzen eingefroren und erst nach der Tiefgefrierkonservierung enzymatisch aufgeschlossen wurden.

Einschichtzellkulturen aus Fischgewebe eignen sich für cytogenetische Studien. Doch wirkt sich auf die Untersuchung genetischer Fragen an i n v i t r o gezüchteten Fischzellen erschwerend aus, daß ähnlich wie bei Mammalierzellen eine Dauerkultivierung von Fischzellen mit unverändertem normalem Karyotyp nicht möglich zu sein scheint.

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÄTIOLOGIE DER SCHWIMMBLASENENTZÜNDUNG DER KARPFEN

A Vorbemerkungen

Infektionskrankheiten bei Fischen werden durch verschiedenartige pathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren verursacht.

Vielen Fischseuchen liegen Mischinfektionen (z.B. Bakterien und Viren) zu Grunde. Bakterielle Infektionen lassen sich von denen, die durch Viren hervorgerufen werden, nur auf Grund des exakten Erregernachweises gegeneinander abgrenzen. Bei einer Reihe von Fischkrankheiten scheinen virale Erreger eine Basis für sekundäre bakterielle Infektionen zu schaffen.

Unter den Infektionskrankheiten der Karpfen findet man neben reinen bakteriellen Erkrankungen wie Flossenfäule, Nieren- und Kiemenschwellung, Tuberkulose u.a., Infektionen mit gesicherter Virusätiologie, wie die akute Form der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens (IBW) oder die Karpfenpockenkrankheit.

Daneben treten Infektionskrankheiten unter den Nutzfischen auf, die vermutlich durch Viren hervorgerufen werden. So scheint der Schwimmblasenentzündung (SBE) der Karpfen, welche neben der infektiösen Bauchwassersucht (IBW) mit hoher Kontagiosität in den Karpfenteichwirtschaften sehr verlustreich auftritt, ebenfalls eine Virusätiologie zu Grunde zu liegen, da es gelang, mit Ultrafiltraten von Organen SBE-kranker Karpfen die Krankheit künstlich zu erzeugen (ARSZANICA, 1969; KUDENCOVA, 1966, 1969; u.a.).

B Schrifttum

1. Infektiöse Bauchwassersucht der Karpfen (IBW) (Infectiuos Dropsy of carp -I.D.-)

1.1. Ätiologie

Die infektiöse Bauchwassersucht der Cypriniden gilt als eine der ältesten und verlustreichsten Karpfenkrankheiten. Das Problem der Erregerfrage wurde vielfach diskutiert. Während einige Autoren eine Bakterienätiologie annahmen, andere eine Virusätiologie vermuteten, betrachteten viele Untersucher eine Virus-Bakterien-Mischinfektion als Krankheitsursache.

SCHÄPERCLAUS (1965) sah in den Bakterien Aeromonas punctata forma ascitae und Pseudomonas fluorescens die eigentlichen Erreger der IBW. Er vermutete aber, daß ein Virus für den Krankheitsausbruch mitverantwortlich sein könnte.

HEUSCHMANN-BRUNNER (1965) bezeichnete die ubiquitär im Wasser vorkommenden Pseudomonadaceaen als fakultative Erreger einer Sekundärinfektion und sah ein Virus als primären Krankheitserreger der IBW an.

VOLF und HAVELKA (1965) dagegen gelang es weder elektronenoptisch noch mit serologischen Methoden, einen Virusnachweis zu erbringen. Gegen die Virustheorie der IBW sprachen auch die nicht einwandfrei geglückten Infektionsversuche mit ultrafiltriertem Organmaterial IBW-kranker Karpfen (VOLF und HAVELKA, 1965; SCHÄPERCLAUS, 1969).

GONCHAROW (1965) vertrat dennoch auf Grund beobachteter Symptomenunterschiede zwischen der natürlich verlaufenden und der mit Aeromonaskulturen künstlich erzielten Erkrankung die Virusätiologie. Außerdem wurden die von GONCHAROW (1965), FAKTOROVICH (1969), BRAUN (1971) u.a. in Körperzellen und in dem Ganglion isthmi zahlreich (1-27) gefundenen cytoplasmatischen, eosinophilen Einschlußkörper als Indizienbeweis für eine Viruserkrankung gedeutet.

TOMASEK und FIJAN (1965) gelang es, mit bakterienfreien Hautfiltraten von IBW-Karpfen cytopathische Effekte in Karpfennierenexplantatkulturen zu erzeugen; die Autoren konnten aber zur Bekräftigung der Virustheorie mit diesem Kulturmaterial die Symptome der IBW reproduzieren.

Schließlich glückte es FIJAN et al. (1971) aus Karpfenbeständen, die an der akuten Form der IBW (Exsudatform) erkrankt waren, nicht aber aus Beständen mit der chronischen Form der IBW (Geschwürsform), ein Virus zu isolieren und mit dem Virusisolat das Krankheitsbild zu reproduzieren. Dieses Virus wurde als das fünfte bisher bekannte fischpathogene R h a b d o v i r u s in die Systematik der Kaltblüterviren eingeordnet und R h a b d o v i r u s c a r p i o benannt.

Von den übrigen vier fisch-(Salmoniden)-pathogenen Rhabdoviren, dem

Egtved-Virus (Virale Hämorrhagische Septikämie der Forellen - VHS -)
(ZWILLENBERG et al., 1965; 1966)

IHN-Virus* (Infektiöse Hämatopoetische Nekrose)
(AMEND und CHAMBERS, 1970)

OSD-Virus* (Oregon Sockeye Disease)
(AMEND und CHAMBERS, 1970)

SRCD-Virus* (Sacramento River Chinook Salmon Disease)
(AMEND und CHAMBERS, 1970)

*Serologische Verwandtschaft nachgewiesen (McCAIN et al., 1971).

unterscheidet sich das R h a b d o v r i u s c a r p i o durch ein höheres Temperaturoptimum i n v i t r o von 20-22°C (FIJAN et al., 1971) im Gegensatz zu 10-15°C (WOLF, 1970) sowie durch eine geringere Affinität gegenüber den RTG-2-Zellen (FIJAN et al., 1971). JØRGENSEN (1971) gelang es nicht, mit Egtved-Immunserum (Kaninchen) das R h a b d o - v i r u s c a r p i o zu neutralisieren (Zit. nach FIJAN, 1972).

1.2. Klinische Erscheinungen und Verlauf

Nach FIJAN et al. (1971) und FIJAN (1972) kann die akute Form der IBW in einem Zeitraum von 1 bis 30 bzw. 60 Tagen ausbrechen. Doch ist die Inkubationszeit weitgehend von der Wassertemperatur des Biotopes abhängig.
Experimentell mit R h a b d o v i r u s c a r p i o infizierte Karpfen zeigten unter Laborbedingungen folgende, durch verschieden hohe Wassertemperaturen beeinflußbare und von der Impfdosis abhängige Inkubationszeiten:

Bei	11-15°C	14-20 Tage
	16-17°C	5-7 Tage
	17-26°C	11-15 Tage.

Während die Mortalität bei den Temperaturen zwischen 11 und 17°C Werte bis zu 90 % aufwies, betrug sie bei 17-26°C dagegen nur 30 %. Wassertemperaturen von 16-17°C scheinen für den Ausbruch der akuten Form optimal zu sein.

Die chronische Form dagegen trat unter Laborbedingungen nach 6-8 Tagen bei Wassertemperaturen von 15-20°C bzw. nach 3-5 Tagen bei Temperaturen von 25-30°C auf. Bei den im Labor gehaltenen infizierten Karpfen betrug die Mortalität über 99 % (FIJAN, 1972).

SCHÄPERCLAUS (1969) berichtete über starke IBW-Massenerkrankungen, die besonders nach der Überwinterung im Frühjahr auftraten. Dabei kam es zu Stückverlusten bis zu 100 %. Der Autor beobachtete, daß bei erstmalig erkrankten Karpfen zuerst die aszitide (akute) später die ulzerative (chronische) Form in Erscheinung trat.

Während sich die akute Form der IBW im allgemeinen im Frühjahr bei steigenden Wassertemperaturen (13-22°C) rasch und mit hoher Mortalität ausbreitete, wurde dagegen die Geschwürsform hauptsächlich während der Sommermonate mit einem rapiden Symptomenausbruch, aber mit geringer Mortalität beobachtet (FIJAN, 1972).
Die ulcerative Form der IBW kann aber auch im Frühling,

Herbst und Winter langsam und langandauernd mit steigenden Verlustquoten auftreten.

SCHÄPERCLAUS (1954, 1965), REICHENBACH-KLINKE (1966), HAVELKA und VOLF (1969), unterschieden vier Grundtypen der IBW:

a) Akute Bauchwassersucht, (Exsudatform).

Diese Form ist an der abdominalen Aufblähung, entzündeten Afterpapille, an Hautrötungen, Exophthalmus sowie anämischen Kiemen zu erkennen.

b) Chronische Bauchwassersucht, (Geschwürsform).

Auffallendes Merkmal sind die Hautentzündungen, Hautnekrosen und eitrigen Geschwüre.

c) Winterform, (HAVELKA und VOLF, 1969).

Für diese Krankheitsform der IBW sind die eingefallenen Augen, der Flossenzerfall sowie Abmagerungen charakteristisch.

d) Darmerkrankung, (HAVELKA und VOLF, 1969).

Die Darmerkrankung der IBW ist besonders durch Entzündungen des Mittel- und Enddarmes gekennzeichnet.

SCHÄPERCLAUS (1965) beschrieb außerdem eine latent verlaufende, subakute Form der IBW, die entweder als Exsudat- oder Geschwürsform in Erscheinung treten kann.

An Karpfen, die an der akuten Form der IBW erkrankt waren, beobachtete FIJAN (1972) eine dunkle Hautfärbung, schwache Respiration sowie neurosensorische Symptome wie Gleichgewichtsstörungen, unkoordiniertes Schwimmverhalten und starke Reizbarkeit. Im weiteren Krankheitsverlauf traten neben Exophtalmus, abdominale Aufblähungen, Afterentzündungen sowie bleiche Kiemen in Erscheinung. Hautgeschwüre wurden bei der akuten Form der IBW nicht beobachtet.

Bei der chronischen Form der IBW dagegen fielen primär Hautentzündungen an verschiedenen Körper- und Flossenpartien auf. In der weiteren Krankheitsentwicklung veränderten sich, vermutlich durch Sekundärinfektion, die Hautentzündungen infolge nekrotisierender Prozesse zu tiefen eitrigen, bis in die Muskulatur hineinreichenden Geschwüren. Im Finalstadium der

Krankheit wurden zusätzlich Exophthalmus und eine generalisierende Ödembildung beobachtet.

REICHENBACH-KLINKE (1971) beschrieb folgende äußere Faktoren, die den Ausbruch der IBW beeinflussen können:

Die Wassertemperaturen (bei 18-28°C höchste Verlustziffern), den Sauerstoffgehalt des Wassers (bei Werten über 150 % O_2 steigende Ausfälle), die pH-Werte des Wassers (Verluste bei Werten zwischen pH 5-8,5), den Wasserchemismus (chemische Beeinflussung) des Biotopes sowie Ernährungsschäden.

Wie schon von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, wurde von FIJAN (1972) angeregt, den Symptomenkomplex der IBW folgendermaßen aufzugliedern:

Akute Form oder Frühlingsviraemie
der Karpfen (spring viremia of carp -SVC-),

eine akut verlaufende infektiöse Karpfenkrankheit von hoher Mortalität (mit Stückverlusten bis zu 100 %). Die Krankheit tritt auf, wenn die Wassertemperaturen des Biotops von 13° auf 22°C ansteigen; die Optimaltemperatur scheint bei 16-17°C zu liegen. Die charakteristischen Symptome sind Peritonitis, Enteritis sowie Blutungen und Ödembildungen im gastrointestinalen Trakt.
Als Erreger wird das R h a b d o v i r u s c a r p i o angesehen.

Chronische Form oder Erythrodermatitis der Karpfen
(carp erythrodermatitis -CE-),

eine subakut bis chronisch verlaufende Karpfenkrankheit mit bisher unbekannter Ätiologie und unterschiedlich hoher Mortalität. Die Infektion tritt besonders während der Sommermonate auf und ist an den hämorrhagisch entzündeten Hautbereichen, die nekrotisierend bis zur eitrigen Geschwürsbildung fortschreiten, zu erkennen. Das Agens ist wahrscheinlich größer als 450 nm, dermotrop und war gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika und Antibiotika (außer Penicillin und Ampicillin) empfindlich, konnte aber auf herkömmlichen Bakteriennährböden nicht kultiviert werden (FIJAN, 1972).

Verschiedene pathologische Veränderungen der Karpfen,

die in dem Gesamtkrankheitskomplex der IBW zwar einbezogen, aber noch näher ätiologisch zu differenzieren sind.

1.3. Pathologische Veränderungen

Fast alle Organe bauchwassersuchtkranker Karpfen sind schwer geschädigt (ZÖBE, 1952; AMLACHER, 1958; FAKTOROVICH, 1969; HAVELKA et al., 1969; BRAUN, 1971; OTTE, 1971; u.a.).

Die Haut der an der chronischen Form der IBW erkrankten Karpfen wies in allen Schichten und in der darunter liegenden Muskulatur umfassende Geschwüre auf. Neben Hyperämien und Blutaustritten in subepidermalem und subcutanem Gewebe waren alle übrigen Hautschichten ödematös durchtränkt und die Muskelstränge stark degeneriert. Außerdem wurden in den einzelnen Hautschichten entzündliche Infiltrate nachgewiesen.

Der Darmtrakt zeigte das Bild einer Enteritis haemorrhagica. Im histologischen Bild fielen die aufgelockerten Bündel der T u n i c a m u s c u l a r i s mit erweiterten Blutkapillaren und Extravasaten sowie Blutungen in der S u b m u c o s a und P r o p r i a auf; das Endothel der Submucosagefäße erschien gequollen. Ferner war das Schleimhaut s t r o m a ödematös verbreitert; leukozytäre Infiltrationen und Schleimhypersekretionen wurden beobachtet.

Die Leber wies unregelmäßig verstreute Herde absterbender Gewebepartien (Nekrosen) auf. Perivasculäre Infiltrate, Wucherungen der Kupferschen Zellen und vakuolige Gallendegenerationen konnten nachgewiesen werden. Gallensekretstörungen waren durch die grüne Verfärbung der Leber erkenntlich. Das beim Karpfen intrahepatisch gelegene P a n k r e a s war nekrotisch geschrumpft, Blut trat an den teilweise perforierten Pfortadern aus.

Die Milz war hyperplasiert und zeigte stark vermehrte Zellen des R e t i k u l o e n d o t h e l i a l - Systems. Neben Makrophagen waren verschieden große Zellen mit basophilem Plasma vorhanden.

Die Niere wies Schwellungen auf, im reticulären Zwischengewebe traten Hyperplasien hervor. Die Zellgrenzen von Epithel und Nierenkanälchen verschwammen und waren teilweise aufgelöst.

Der Herzmuskel war entzündet, die Herzmuskelfasern ödematös verändert. Im P e r i c a r d wurden Infiltrationen von Zellen verschiedenster Beschaffenheit (Leukozyten, Histiozyten u.a.) beobachtet; außerdem traten subendocardiale Gewebswucherungen und Fibrinablagerungen in der Skelettmuskulatur hervor.

Im Gehirn von IBW-Karpfen wurden von verschiedenen Autoren (FAKTOROVICH, 1969; BRAUN, 1971) im G a n g l i o n i s t h m i 0,2-2,5 u große eosinophile, cytoplasmatische Einschlußkörper gefunden. Das Vorkommen lag bei der akuten Form der IBW bei 100 %, bei der chronischen Form bei 20-40 % der untersuchten Fälle. In Karpfen aus IBW-freien Beständen und in Karpfen mit Schwimmblasenentzündung fehlten derartige Einschlüsse (SCHÄPERCLAUS, 1969). Ob die geschilderten Elementarkörper aber ursächlich mit einem Erreger in Zusammenhang gebracht werden können, ist ungeklärt.

FIJAN (1972) stellte einige pathologische Charakteristika der akuten Form (Spring viremia) und der chronischen Form (Erythrodermatitis) der IBW heraus:

Die akute Form war besonders gekennzeichnet durch das Auftreten einer Peritonitis mit serös-eitrigem Exsudat sowie schweren katarrhalen haemorrhagischen Darmentzündungen, ödematös durchtränkten Eingeweiden, Petechien in Herz, Leber, Niere, Darm, in den Skelettmuskeln und in der inneren Schwimmblasenwand.

Bei der chronischen Form wiesen die inneren Organe von Karpfen mit kleinen Hautgeschwüren keine wesentlichen Veränderungen auf. Peritonitis und schwere Enteritis sowie Eingeweidehämorrhagien wie sie bei der akuten Form (SVC) charakteristisch sind, wurden bei experimentell infizierten Karpfen nicht beobachtet. Erst im Finalstadium der Krankheit waren neben ödematösen Organveränderungen Aszites und eine milde auf das Darmende beschränkte katarrhale Enteritis zu erkennen.

2. Schwimmblasenentzündung der Karpfen (SBE) (Swim-bladder inflammation of carp)

2.1. Ätiologie

Die Ätiologie der SBE ist noch unklar. Einzelne Autoren vertreten verschiedene Auffassungen bezüglich der Erregerfrage. So sahen KANAEV et al. (1963) Ernährungsstörungen infolge Aminosäuren- und Vitaminmangel als Krankheitsursache an. ARSZANICA (1966) beobachtete dagegen, daß die Krankheit auch in den Beständen auftrat, in denen die Karpfen mit physiologisch ausgewogenem Futter ernährt worden waren.

Neben Algen und Fadenpilzen (SZAKOLCZAI, 1967) wurden verschiedene Parasiten (Cryptobien, Myxosporidien, Coccidien) in der Schwimmblase von SBE-Karpfen gefunden (HOFER, 1904; PLEHN, 1924; SZAKOLCZAI, 1965; OTTE, 1966).

Die meisten Autoren sahen aber keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Parasitenbefall und der SBE.

Während KOCYLOWSKI (1967) infolge der Nahrungsfermentation im entzündeten Gastrointestinaltrakt saprophytische Bakterien als Krankheitserreger diskutierte, sahen MARKIEWICZ (1967) und MATTHEIS (1969) diese Theorie als fragwürdig an.

Auf Grund der seuchenhaften Ausbreitung der SBE sind sich die meisten Autoren über die Kontagiosität dieser Krankheit einig. So konnte ARSZANICA (1966, 1969), ARSZANICA et al. (1968), ARSZANICA et al. (1969), durch Haltung von infizierten Karpfen zusammen mit gesunden die Krankheit übertragen. MARKIEWICZ (1967), KULOW und MATTHEIS (1969) kamen zu ähnlichen Ergebnissen.

Verschiedene Bakterienarten wie A e r o m a d e n, P s e u d o m o n a d e n, M i k r o k o k k e n u.a., wurden in den inneren Organen von SBE-Karpfen gefunden (KANAEV, 1963; OTTE, 1966; KANAEV et al., 1967; SZAKOLCZAI, 1967; MATTHEIS und KULOW, 1967; u.a.) und als Krankheitsursache angesehen.

SCHÄPERCLAUS (1969) machte besonders A e r o m o n a s p u n c t a t a als Krankheitsursache verantwortlich. Der Autor fand dieses Bakterium massenhaft bei den erkrankten

Karpfen konnte allerdings damit die Krankheit nicht künstlich reproduzieren.

Nach HEUSCHMANN-BRUNNER (1971) ist aber eine Differenzierung zwischen fischpathogenen und apathogenen Aeromonasstämmen auf Grund ihres biochemischen Verhaltens nicht möglich. Pathogene wie apathogene Stämme wurden sowohl in gesunden wie in kranken Fischen, als auch im Wasser nachgewiesen.

KOCYLOWSKI et al. (1970) beobachteten 48 Stunden p.i. mit sehr hohen Impfdosen ($1,7-2x10^5$ Bakt./0,4 ml) von A e r o m o n a s s p e z. und P s e u d o m o n a s f l u o r e s c e n s, Petechien und Fibrinansammlungen in der Schwimmblasenwand.

KANAEV et al. (1963) berichteten dagegen, daß alle Versuche einer künstlichen Infektion von Karpfen mit repräsentativen Bakterienstämmen erfolglos blieben. Ebenso konnten MATTHEIS und KULOW (1967) und SZAKOLCZAI (1967) die SBE durch intraperitoneale Injektionen von Bakterien nicht erzeugen.

Durch i.p.-Applikation verschiedener Bakterienarten (z.B. P s e u d o m o n a d a c e a e n) gelang es KANAEV et al. (1967) lediglich IBW-Symptome zu erzielen, wobei die Schwimmblasen der infizierten Karpfen aber keine pathologischen Veränderungen aufwiesen. Die Autoren folgerten, daß Bakterien bei der SBE keine ätiologische Bedeutung haben.

LOBUNCOV (1966) schloß, daß die Bakterien nur von sekundärer ätiologischer Bedeutung für die SBE seien.

Dagegen konnten KUDENCOVA (1966), MARKIEWICZ (1966 a und b), ARSZANICA (1969) und KUDENCOVA (1969), nach intraperitonealer Injektion von Ultrafiltraten aus Organen (Gehirn, Schwimmblase u.a.) von SBE-Karpfen die Krankheit künstlich erzeugen. Dies bekräftigte die bereits von mehreren Autoren diskutierte Virusätiologie der SBE (MARKIEWICZ, 1966 a und b; MATTHEIS und KOLOW, 1967; MATTHEIS, 1969; SCHÄPERCLAUS, 1969; u.a.).

Obwohl RUDIKOV (1966) auf Karpfenmilz- und -nierenzellkulturen mit bakterienfreien Gewebesuspensionen SBE-kranker Karpfen keinen CPE erzielen konnte, betrachtete der Autor die Ätiologiefrage als ungeklärt.

Für eine Virusätiologie sprachen die erfolglos durchgeführten Therapieversuche bei SBE-Karpfen mit Leukomycininjektionen. Behandelte und unbehandelte Fische wiesen weiterhin die SBE-Symptome auf (BRAUN, 1972).

GEWKAN (1966) und v.LUKOWICZ (1972) beobachteten das Auftreten der SBE auch unter IBW-kranken Beständen. v.LUKOWICZ (1972) fand in mehreren Fällen bei SBE-Karpfen eine chronische Form mit Geschwüren an Haut und Muskeln sowie eine Aszitesform, wie sie bei der IBW vorkommen.

Dagegen konnten ARSZANICA und BAUER (1972) Hämorrhagien und Geschwüre bei SBE-kranken Karpfen in keinem Falle beobachten.

Histopathologische Untersuchungen ließen OTTE (1971) sowie andere Autoren Parallelen zwischen SBE und IBW erkennen und es wurde diskutiert, ob die SBE eine neue Form der IBW darstelle.

2.2. Klinische Erscheinungen und Verlauf

Wegen des bisher fehlenden Ätiologienachweises der SBE konnte die Inkubationszeit der Krankheit noch nicht sicher bestimmt werden.

Basierend auf den Infektionsergebnissen mit Ultrafiltraten von Organen der SBE-Karpfen, leiteten ARSZANICA (1969) und KUDENCOVA (1969) eine Inkubationszeit von ca. einem Monat bei Wassertemperaturen von 19-22°C ab; bei niedrigeren Temperaturen (unter 16°C) verlängerte sich die Inkubationszeit wesentlich (bis zu 8 Monaten).

Während SCHÄPERCLAUS (1969) Inkubationszeiten von 1 1/2 bis 8 Monaten angab, beobachtete ARSZANICA (1969) bei gemeinsamer Haltung von gesunden und SBE-Karpfen nach 1 bis 2 1/2 Monaten SBE-Symptome bei den gesunden Fischen.

Nach ARSZANICA und BAUER (1972) beträgt die Inkubationszeit während der Sommermonate 1 1/2 bis 2 1/2 Monate.

Die Wassertemperaturen scheinen nach ARSZANICA (1969) und KUDENCOVA (1969) die Virulenz des Erregers der SBE stark zu

beeinflussen. Während bei Temperaturen von 15 bis 20°C höchste Verlustquoten (36-97 %) beobachtet wurden, nahm die Mortalität der Fische bei Wassertemperaturen unter 13°C merklich ab.

Nach KULOW und MATTHEIS (1969) lag die Erkrankungsrate im Frühjahr zwischen 0 und 5 %, stieg aber im Juni und Juli (Stadium I a) stark an. Zum Unterschied von der infektiösen Bauchwassersucht (IBW) stellt die Schwimmblasenentzündung (SBE) eine ausgesprochene Sommerkrankheit der Karpfen dar.

Alle Altersklassen der Karpfen (Zuchtkarpfen, Wildkarpfen und ihre Hybride) können an SBE erkranken. Nach KULOW und MATTHEIS (1969) liegen die Verluste der K_{1-2} bei Erstinfektion zwischen 36,2-96,7 %, bei K_{2-3} zwischen 11,6-96,7 % und bei K_{v-1} bei 62,5-67,5 %.

Im protrahierten Stadium der Krankheit wurden von mehreren Autoren (KULOW und MATTHEIS, 1969; OBERMEIER, 1970; ARSZANICA und BAUER, 1972; u.a.) folgende Symptome beobachtet:

Herumstehen der Fische in Schwärmen an der Wasseroberfläche, Nahrungsverweigerung, verminderter Fluchtreflex, Rücken- und Seitenlage, Drehbewegungen, Kopfstehen, aufgetriebene Bäuche (besonders im caudalen Bereich), Afterentzündungen und Aftervorwölbungen.

BRAUN (1969) beschreibt außerdem als weiteres Charakteristikum der SBE einen einseitig ausgefallenen Augendrehreflex.

ARSZANICA et al. (1969), ARSZANICA und BAUER (1972), unterscheiden drei Verlaufsformen der SBE:

<u>Akute Form</u>

Die akute Form ist saisonbedingt und tritt mit hohen Verlustquoten während der Sommermonate (Juni-Juli) auf. Die geschwächten Karpfen verweigern die Nahrungsaufnahme und zeigen ein gestörtes hydrostatisches Gleichgewicht (z.B. Seitenlage, Kopfstehen) sowie unkontrollierte Bewegungsabläufe. Der Bauch ist im caudalen Bereich aufgetrieben.

Chronische Form

Die chronische Form kann während des ganzen Jahres beobachtet werden. Die Fische nehmen wenig Nahrung auf und zeigen nur vereinzelt äußerlich sichtbare Krankheitsmerkmale der SBE. Die Karpfen sterben kontinuierlich über das ganze Jahr verteilt.

Klinisch inapparente Form

Die klinisch inapparente Form verläuft symptomlos und kann je nach Umweltbedingungen in die akute Form übergehen.

Nach KULOW und MATTHEIS (1969) scheint das Verhältnis der akuten zu den chronischen Fällen in den einzelnen Ländern offensichtlich unterschiedlich zu sein, da z.B. in der UdSSR überwiegend akute Krankheitsfälle auftraten, in der DDR dagegen die chronische Verlaufsform überwog.

Es wird angenommen, daß die Hauptverbreitung der SBE von verschiedenen Satzfischbetrieben ausgeht (OBERMEIER, 1970).

Nach ARSZANICA und BAUER (1972) erwiesen sich Rogner weniger infektiös als junge Karpfen; Eier und Milch waren nicht infiziert.

Nach KULOW und MATTHEIS sind Karpfen vorallem im Erkrankungsstadium I gefährliche Infektionsträger, während diese Fische selbst in dem Stadium weniger gefährdet sind.

2.3. Pathologische Veränderungen

Die pathologischen Veränderungen konzentrieren sich bei der SBE hauptsächlich auf die Schwimmblase. Verschiedene Autoren (KUDENKOVA, 1966, 1969; MATTHEIS und KULOW, 1967; MATTHEIS, 1969; BRAUN, 1969; SCHÄPERCLAUS, 1969; KANAEV et al., 1970; KULOW und MATTHEIS, 1969; OBERMEIER, 1970; OTTE, 1971; ANTYCHOWICZ, 1972; ARSZANICA und BAUER, 1972; u.a.) beobachteten bei Krankheitsbeginn Blutgefäßdilatationen, Wandtrübungen und Petechien an beiden Schwimmblasenkammern.

Mit Krankheitsfortschritt bildeten sich in der Schwimmblase ödematöse Ergüsse, verdichteten sich die einzelnen Schwimmblasenschichten und es entstanden infolge der entzündlich

proliferativen Prozesse neue ablösbare, durch Fibrin- und Bluteinlagerungen gelblich-rotgefärbte Beläge. Die zunehmenden nekrotischen Bereiche in den einzelnen Schwimmblasenschichten führten zu lokalen Gewebslücken, die teilweise vom P e r i t o n e u m abgedeckt worden waren. Resultierende Störungen im Gasaustausch schienen die Gleichgewichtsstörungen nach sich zu ziehen. Allmählich verwuchs das P e r i - t o n e u m mit dem gesamten Schwimmblasentrakt und zeigte das Bild einer P e r i t o n i t i s. Die P r a e v e s i c a war häufig deformiert und enthielt meistens eine blutigseröse bzw. eitrige Flüssigkeit.

Das Endstadium der Krankheit war durch eine massive Zerstörung und völlige Reduktion der Schwimmblase zu einer gelblich braunen verdickten Masse gekennzeichnet. Neben umfangreichen Bindegewebswucherungen des P e r i t o n e u m s mit Organverwachsungen traten besonders Zystenbildungen hervor.

Die pathologisch-anatomischen und histopathologischen Untersuchungen (KULOW und MATTHEIS, 1969; u.a.) weisen insgesamt darauf hin, daß auf die Störungen der Hämodynamik in den Organen Entzündungen folgen. Die anfänglichen serösen Ödembildungen und alterativen Abläufe scheinen später in proliferativ-degenerativ-nekrotische Prozesse überzugehen.

Heilungsprozesse waren in den Monaten August und September beobachtet worden, wobei sich die Petechien und hämorrhagischen Partien der Schwimmblasenwand zu braun bis schwarzen Flecken verfärbten, gefolgt von Narbenbildungen des entzündeten Schwimmblasengewebes.

Histologische Untersuchungen der Schwimmblase (BRAUN, 1969; KULOW und MATTHEIS, 1969; OTTE, 1971; u.a.) zeigten, daß die Veränderungen von der stark erweiterten gefäßführenden Schicht des inneren Schwimmblasenblattes ausging. Im weiteren Verlauf bildete sich zwischen der äußeren Schicht der Schwimmblase und dem inneren Anteil ein mit Eiter gefüllter Hohlraum. Starke Leukozyten-, Erythrozyten- und Histiozyten-Infiltrationen bedingten, daß die muskulösen Bindegewebsschichten des inneren Blattes durch Quellung der Fasern verändert wurden. Das ein-

schichtige Plattenepithel wurde mehrschichtig, die Epithelzellen erschienen gequollen und wiesen ein basophiles Zytoplasma mit vergrößerten Kernen auf. Die L a m i n a p r o p r i a zeigte eine lockere Struktur. Bei fortgeschrittener Krankheit traten auch Veränderungen in der T u n i c a f i b r o s a auf. Weiter fanden Hohlraumausgranulierungen und Bindegewebsneubildungen im Schwimmblasenbereich statt. Ferner wurden neben fokalen Nekrosen intensive proliferative Prozesse und größere Blutansammlungen sowie zapfenartige hellbraun gefärbte Auswüchse zum Schwimmblasenlumen hin beobachtet.

Die Niere war schon im subakuten Stadium der Krankheit hyperämisch und geschwollen, hatte eine schwammig weiche Konsistenz und verfärbte sich meist blaurot. Bei der akuten Form enthielt das lymphoide Gewebe reichlich Leukozyten, das Bild der Hydronephrose trat verstärkt hervor. Mit Krankheitsfortschritt erschien die geschwollene Niere infolge einer Anämie durch partiellen Funktionsausfall des hämatopoetischen Gewebes häufig blaßrot bis blauweiß.

Die Milz wies ebenfalls Schwellungen auf; es speicherten sich in erhöhtem Maße Blutzellen. Neben allgemeiner Hyperplasie und Proliferation der Gefäßadventitia und des perivaskulären, retikulo-histiozytären Gewebes wurden Bildungen von lymphohistiozytären Knötchen im Parenchym beobachtet. Auffallend war außerdem die relativ harte Konsistenz des Organs.

In der blassen Leber zeichneten sich harte bindegewebsähnliche Strukturen ab. Im Bereich der Kapillargefäße stellte man perivasculäre Infiltrate (Lymphozyten, Leukozyten) fest und fand typische Wucherungen der Kapillarendothelien. Das Parenchym war fettig degeneriert, das pankreasumkleidete Pfortadersystem zeigte zirrhotische Veränderungen.

Das Herz wies neben Perikardergüssen sich unter dem E p i k a r d im Gewebe stauende Blutmassen auf. Histologisch schien die Muskulatur aufgefasert.

Im Gehirn fielen neben einer Vermehrung des Liquors gerötete Gehirnteile auf. Histopathologische Schnitte zeigten in allen Hirnbezirken eine kapillare Hyperämie, besonders im Bereich der Rindenschicht. Außerdem wurden zwischen Meningen und der grauen Substanz ödematöse Gewebslücken gefunden.

Der Darmtrakt ließ im akuten Stadium der Krankheit die Symptome einer Enteritis katarrhalis mit Eiteransammlungen im Lumen sowie Schleimhautveränderungen erkennen.

KULOW und MATTHEIS (1969) führten auf Grund der Zusammenhänge zwischen dem zeitlichen Ablauf der Erkrankung und dem Grad der pathologischen Veränderungen der Schwimmblase folgende fünf Krankheitsstadien an:

Stadium I a:

Petechiale Blutungen verschiedener Größe in der äußeren Schwimmblasenwand als klinisches Zeichen des Krankheitsbeginns oder einer leichten Erkrankung.

Stadium I b:

Braune bis schwarze Punkte oder Flecken in der Schwimmblasenwand (Hämochromogene) als Ausdruck einer überstandenen leichten Erkrankung ohne weitere Komplikationen.

Stadium II:

Partielle oder vollständige Verdickung der Schwimmblasenwände bei fortschreitender Exsudation als Zeichen des Fortschreitens der Entzündung.

Stadium III:

Partielle Zerstörung der Schwimmblase infolge Nekrobiose und Nekrose als Zeichen einer schweren Aerocystitis.

Stadium IV:

Zystenbildung unter Einschluß der Schwimmblase, wobei die sekundäre Peritonitis gegenüber der Aerocystitis dominiert.

Wegen der fließenden Übergänge der einzelnen Stadien ist die Unterscheidung des jeweiligen Krankheitsgrades oftmals erschwert.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Virusisolierung

1.1.1. Herkunft und Aufarbeitung des Organmaterials

Aus dem Fischbestand der Abwasserversuchsanlage München-Großlappen (Bayerische Biologische Versuchsanstalt, München) kamen im Juni 1971 Karpfen (K_1 von ca. 200 g Gewicht) mit den Symptomen und pathologischen Veränderungen der Schwimmblasenerkrankung (Kopfstehen, einseitig ausgefallener Augendrehreflex, ödematöse Bauchauftreibung im caudalen Bereich, Afterentzündung, Petechien und Trübungen in der Schwimmblasenwand, Milz- und Nierenschwellungen, blasse Leber, entzündeter Gastrointestinaltrakt) zur virologischen Untersuchung.

Von fünf dieser Tiere wurden nach Tötung durch Genickschnitt die Gehirne unter sterilen Bedingungen herauspräpariert, homogenisiert und mit einer antibiotika- und laktalbuminhaltigen (0,5 %ig) Earle-Lösung 1:10 verdünnt. Die durch Zentrifugation (2200 x g, 10 Min.) geklärte Suspension kam anschließend zur Ultrafiltration durch ein Millipore-Membranfilter[1] von 450 nm Porenweite und erhielt die Versuchsbezeichnung 10/3.

Weiterhin wurden in den Monaten Februar, Mai, Juni 1972 SBE-verdächtige sowie gesunderscheinende K_1, K_{2-3} aus verschiedenen Beständen virologisch untersucht. In diesen Fällen dienten jeweils Organpools (Leber, Niere, Milz, Darm, Herz, Schwimmblase, Gehirn) als Ausgangsmaterial, welches wie oben beschrieben weiterverarbeitet und auf Zellkulturen angezüchtet worden ist.

[1](Millipore GmbH, 6078 Neu Isenburg)

1.1.2. Zellkulturen

Die Virusanzüchtung erfolgte sowohl auf Fischzellkulturen (Primär- und Subkulturen von Karpfen- und Forellengeweben sowie Fischzell-Linien) als auch auf Warmblüterkulturen (Primärzellen und permanente Zell-Linien).

Primärkulturen aus Gonaden-, Herz- und Schwimmblasengewebe des Karpfens (C y p r i n u s c a r p i o L.) und der Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i Rich.) wurden nach den im Teil II (Fischzellkulturen) beschriebenen Methoden hergestellt. Primär- und Subkulturen aus Karpfen- wie Forellengewebe sind mit dem Anzuchtsmedium HMEM (s.Teil II, 1.1.2.), bestehend aus der Salzlösung nach HANKS (1948), dem Minimal Essential Medium nach EAGLE (1959) und 0,5 % Laktalbumin, 10 % Kälberserum, 1 % Phenolrot (0,1 %ig) sowie Antibiotika (Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 100 Gamma/ml, Polymyxin 50 Gamma/ml, Neomycin 50 Gamma/ml, Mycostatin 50 I.E./ml) bei stationärer Bebrütung (Forellenzellen bei 20-22°C, Karpfenkulturen bei 28°C) angezüchtet worden. Nach Ausbildung eines dichten Zellrasen wurden die Karpfenzellkulturen bei 20-22°C gehalten. Bei allen dichtgewachsenen Zellkulturen ist der Kälberserumanteil im Medium auf 3 % reduziert worden (Erhaltungsmedium).

Die Zellen der RTG-2-Zell-Linie (CCL-55; WOLF und QUIMBY, 1962), aus Gonaden der Regenbogenforelle (S a l m o g a i r d n e r i) stammend, wurden bei 20-22°C mit HMEM und nichtessentiellen Aminosäuren (s.Teil II, 1.1.2.) gezüchtet. Sie wiesen einen reinen fibroblastenähnlichen Wuchstyp auf.

Die epithelartigen Zellen der FHM-(Fathead minnow)-Zell-Linie (CCL-42; GRAVELL und MALSBERGER, 1965), aus caudalem Gewebe des Cypriniden P i m e p h a l e s p r o m e l a s angelegt, vermehrten sich bei 20-22°C mit EMEM (s.Teil II, 1.1.2.), bestehend aus der Salzlösung nach EARLE (1934), dem Minimal Essential Medium nach EAGLE (1959) und 0,5 % Laktalbumin, 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Phenolrot (0,1 %ig)

sowie Antibiotika (Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 100 Gamma/ml, Polymyxin 50 Gamma/ml, Neomycin 50 Gamma/ml, Mycostatin 50 I.E./ml). Bei dichtgewachsenen Kulturen wurde der Serumzusatz im Medium auf 3 % herabgesetzt.

Außer folgenden nach Standardmethoden durch Trypsinierung gewonnenen Warmblüterprimärkulturen
embryonale Kälbernieren[1]
embryonale Hühnerfibroblasten[1]
Schweinenieren[2]
wurden die permanenten Säuger-Zell-Linien

BHK-21 (C-13)	Hamster-kidney (Syrian)[3]	CCL 10
Hep-2	Human-Larynx-carcinoma	CCL 23
VERO	Monkey-kidney (African Green)[2]	CCL 81

zur Isolatanzüchtung verwendet.

Als Anzuchtmedien dienten:

[1]= EARLE's-Salzlösung (EARLE, 1934)
+ 0,5 % Laktalbumin + 10 % Kälberserum + Antibiotika (Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 50 Gamma/ml, Polymycin 50 Gamma/ml).

[2]= HANKS-Salzlösung (HANKS, 1948)
+ 0,5 % Laktalbumin + 10 % Kälberserum + Antibiotika (w.o.).

[3]= L_{15}-Medium (LEIBOVITZ, 1963)
+ 10 % Kälberserum + Antibiotika (w.o.).

Bei den genannten Medien wurde zur Kulturerhaltung der Kälberserumzusatz auf 3 % reduziert.

Zur Zellzüchtung und Isolatvermehrung kamen je nach Verwendungszweck die auf Seite 44 aufgeführten Zuchtgefäße in Anwendung.

1.1.3. Verimpfung und Passierung des Materials

Bei Erstverimpfungen wurden jeweils 0,2 ml der bakterienfrei filtrierten (450 nm) Organsuspension direkt in das Medium der Zellkulturröhrchen gegeben. Weitere Passagen erfolgten mit Hilfe der Adsorptionsmethode, wobei den Kulturen zunächst

das Medium entzogen und der Zellrasen daraufhin mit dem zu passierenden Material beimpft wurde. Die Animpfmenge betrug 0,5 ml pro Reagenzglas-, 1 ml pro Leighton-tubes-, 2 ml pro Vierkantflaschen- und 10 ml pro Roux-Schalen-Kultur.

Nach einer einstündigen stationären Bindezeit bei Raumtemperatur wurde das Animpfmaterial wieder entfernt, die Kulturen mit PBS (=Phosphate Buffered Saline; DULBECCO und VOGT, 1954) einmal gewaschen und anschließend mit Erhaltungsmedium überschichtet.

Die weitere Inkubation der infizierten Fischzellkulturen erfolgte bei 20-22°C.

Warmblüterzellkulturen wurden nach der Infektion zur Isolatvermehrung ebenfalls bei 20-22°C inkubiert.
Konnten im Verlauf einer 7-14tägigen Beobachtungszeit virusspezifische Veränderungen des Zellrasens festgestellt werden, so erfolgte bei einem zu 80 % ausgebildeten cytopathischen Effekt die Ernte des infektiösen Materials, wozu durch einmaliges Einfrieren bei -70°C und Wiederauftauen die Zellen aufgeschlossen wurden. Nach Probeentnahmen für die Titerbestimmung und für die Sterilitätskontrollen (Bakteriennährböden) wurde das infektiöse Zellkulturmedium zellfrei zentrifugiert (2200 x g, 1o Min.), und entweder weiterpassiert oder bei -70°C aufbewahrt.
Trat in der Anzuchtpassage kein cytopathischer Effekt auf, so ist das Material nach mindestens drei Blindpassagen verworfen worden.

1.2. Charakterisierung des Isolates 10/3

1.2.1. Vermehrung in Zellkulturen

1.2.1.1. Titrationen

Die zu titrierenden Proben wurden in 10er Potenzen (2,7 ml Medium, 0,3 ml infektiöses Material) mit einer antibiotikahaltigen (=Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 50 Gamma/ml, Polymycin 50 Gamma/ml) EARLE-Lösung (+0,5 % Laktalbumin und

3 % fötales Kälberserum) verdünnt; davon kamen pro Verdünnungsstufe je 0,1 ml in das Medium (1,5 ml) von drei Kulturröhrchen.

Außer den Titrationen in Zellkulturröhrchen erfolgte die Bestimmung der Kultur-Infektions-Dosis auch in Mikroplatten. Hierzu wurden nach Einsaat von 0,1 ml Zellsuspension ($4x10^5$ Zellen/ml) stets drei Plattenvertiefungen mit 0,1 ml der jeweiligen, in Röhrchen hergestellten Verdünnungsstufe beimpft.
Für sämtliche Titrationen sind FHM-Zellkulturen herangezogen worden.
Der Titrationsendpunkt wurde nach drei Tagen auf Grund des cytopathischen Effektes ermittelt. Die Berechnung der KID_{50}/0,1 ml erfolgte nach der Methode KAERBER (1931).

1.2.1.2. Vermehrung bei verschiedenen Temperaturen

Zur Feststellung der optimalen Vermehrungstemperatur des Isolates 10/3 wurden dichte, in Falconflaschen (25 cm^2) gezüchtete FHM-Zellen mit 1 ml des Materials der 13. Passage ($10^{7,2}KID_{50}$/0,1 ml) nach dem Adsorptionsverfahren beimpft. Die Inkubation der infizierten Kulturen erfolgte bei den Temperaturen 4° - 15° - 22° - 25° - 28° - 33° - 37°C.

Die Infektionsitätstiter der einzelnen Proben wurden nach einmaligem Einfrieren bei -70°C und Wiederauftauen auf FHM-Zellen zum Zeitpunkt 0 (nach der Adsorption) sowie 24 - 48 - 72 Stunden p.i. bestimmt.

1.2.1.3. Einschrittvermehrungskurve

Dichte FHM-Deckglaszellkulturen in Leighton-tubes gezüchtet, wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS (Phosphate Buffered Saline, DULBECCO und VOGT, 1954) mit 1 ml des auf 5 KID_{50}/Zelle eingestellten Isolates 10/3 (13. Passage, $10^{7,2}KID_{50}$/0,1 ml) zur zweistündigen Adsorption bei Raumtemperatur beimpft. Nach Abgießen des Animpfmaterials und anschließendem viermaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Übertragung der infizierten Deckglaskulturen in neue Leighton-tubes. Danach

wurden die Kulturröhrchen jeweils mit 2 ml Erhaltungsmedium beschickt und bei 20-22°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Infektionstiter kamen die in zweistündigem Rhythmus insgesamt 24 Stunden lang abgenommenen und bei -70°C eingefrorenen und wiederaufgetauten Proben zur Titration auf FHM-Zellen.
Pro Entnahmezeit wurden drei Fraktionen austitriert:

a) Gesamtkultur (Überstand und Zellen)
b) Mediumphase (zellfreier Überstand)
c) Zellphase (gewaschene Zellen).

1.2.1.4. Plaquebildung

Für die Plaqueherstellung wurden FHM-Zellen ($2x10^6$ Zellen/Kulturgefäß) in Petrischalen (60x15 mm; Fa. Greiner, Nürtingen) mit Anzuchtsmedium (EARLE-Lösung, 0,5 % Laktalbumin, 10 % fötales Kälberserum, Antibiotika: Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 50 Gamma/ml, Polymyxin 50 Gamma/ml) unter 5 % CO_2-Zufuhr bei 20-22°C gezüchtet. Auf die zweimal mit Earle-Lösung gewaschenen dichten Kulturen kam jeweils 1 ml des in 10er Potenzen vorverdünnten Animpfmaterials zur Adsorption bei Zimmertemperatur. Angeimpft wurde das Isolat 10/3 (12. Passage, $10^{6,8}KID_{50}$/0,1 ml) sowie das R h a b d o - v i r u s c a r p i o* (FIJAN et al., 1971); (6. Passage, $10^{5,5}KID_{50}$/0,1 ml). Nach der einstündigen Adsorption bei Raumtemperatur wurden die infizierten Kulturen zweimal mit EARLE-Lösung gewaschen, mit 5 ml tylosehaltigem Erhaltungsmedium überschichtet und unter 5 % CO_2-Zufuhr bei 20-22°C inkubiert. 72 Stunden später erfolgte die Fixierung und Färbung der gewaschenen Kulturen (Earle-Lösung) mit einer Formalin-Alkohol-Kristallviolettlösung.
Als Kontrolle liefen jeweils mit:
Infizierte Zellkulturen mit tylosefreiem Medium,
nichtinfizierte Zellkulturen mit tylosehaltigem Medium.

*Von Doz.Dr. N.FIJAN, Zagreb, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das tylosehaltige Erhaltungsmedium wurde wie folgt hergestellt:

Trockensterilisierte Methylzellulose (MH 4000, Fa. Kalle AG, Wiesbaden) ist in 0,75 %iger Konzentration dem Erhaltungsmedium (EARLE-Lösung, EAGLE-Minimal-Essential-Medium, 0,5 % Laktalbumin, 3 % fötales Kälberserum, Antibiotika: Penicillin 100 I.E./ml, Streptomycin 50 Gamma/ml, Polymyxin 50 Gamma/ml) zugefügt und durch aufeinander folgendes, sechsmaliges Einfrieren bei -20°C und Wiederauftauen im Medium gelöst worden (SCHWÖBEL, 1961).

1.2.2. Hämagglutinationstest, Immunserumherstellung

Hämagglutinationstest

Um hämagglutinierende Eigenschaften des isolierten Agens zu prüfen, wurden in zweier Potenzen steigende Verdünnungen des Isolates (0,05 ml einer 0,85 %igen NaCl-Lösung und 0,05 ml Isolat) in Mikroplatten (Fa. Cooke Engineering Co., Alexandria, USA) hergestellt.

Als Indikator dienten Erythrozyten (0,05 ml einer 0,5 %igen Suspension) von Meerschweinchen, Huhn, Gans, Forelle, Karpfen und Menschen Gruppe 0 bei 4, 15, 25, 37°C und wechselnden pH-Werten.
Die Ablesung der inkubierten Reaktionsgemische erfolgte nach Sedimentation der Erythrozyten (1-5 Stunden).

Immunserumherstellung

Mit antigenhaltigen Zellkulturmedien des Isolates 10/3 (11. und 12. Passage, $10^{6,2}$ bzw. $10^{6,8}KID_{50}$/0,1 ml) sowie des R h a b d o v i r u s c a r p i o (6. Passage, $10^{5,5}KID_{50}$/0,1 ml) wurde versucht, Meerschweinchen und Kaninchen zu immunisieren.

Die Meerschweinchen erhielten vom Antigenmaterial am 1. Tag 8 ml i.p., 2 ml s.c., 2 ml i.m., sowie am 14. und 28. Tag je 2 ml i.p. injiziert.
Die Kaninchen wurden mit dem 1:1 mit inkompletten Freund'schem Adjuvans gemischten Antigenen fünf Wochen lang einmal wöchent-

lich mit je 1 ml i.v., i.m., i.p., s.c. beimpft. Eine Boosterimpfung schloß sich in der 7. Woche (2 ml s.c., 2 ml i.m., 6 ml i.p.) und 11. Woche (5 ml s.c., 5 ml i.m., 10 ml i.p.) mit adjuvansfreien Antigensuspensionen an.

Die Entblutung erfolgte unter Äthernarkose durch Herzpunktion; bei den Meerschweinchen nach 6, bei den Kaninchen nach 13 Immunisierungswochen.

1.2.3. Tierversuche

Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.) von ca. 200 g Körpergewicht und Giebel (C a r a s s i u s a u r a t u s g i b e l i o Bl.) von ca. 150 g Gewicht sind jeweils getrennt (maximal fünf Versuchstiere/Becken) in 50-75 l Durchlaufbecken mit Sauerstoffzufuhr gehältert worden. Die Wassertemperatur betrug 14-17°C.

Guppies (L e b i s t e s r e t i c u l a t u s P.) konnten in einem mit 500 ml Wasser (20-22°C) gefüllten Becherglas (maximal fünf Fische) über längere Zeiträume hinweg gehalten werden.

Äußerlich und innerlich gesund aussehende Karpfen und Giebel wurden mit je 2 ml des ultrafiltrierten (450 nm) Isolates 10/3 der 11. und 12. FHM-Passage ($10^{6,2}$ bzw. $10^{6,8}KID_{50}/0,1$ ml) i.p. beimpft.

Die Kontrolltiere bekamen jeweils die gleiche Menge nichtinfektiöses Medium i.p. appliziert.

Die Infektion der Guppies erfolgte dadurch, daß 15 ml einer ultrafiltrierten (450 nm) infektiösen Probe der 11. FHM-Passage ($10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) direkt dem Wasser im Becherglas hinzugefügt wurde.

Die Kontrolltiere erhielten im Wasser nichtinfektiöses Medium.

Den nach experimenteller Infektion gestorbenen Karpfen und Giebeln wurde unter sterilen Bedingungen Milz-, Herz-, Niere-, Gehirn-, Schwimmblase-, Leber-, Darm- und Muskelgewebe entnommen und für die Reisolierung bzw. Titration bei -20°C aufbewahrt.

Guppies sind im ganzen weiterverarbeitet worden.

1.2.4. Viruskonzentration, Bestimmung der Dichte und Elektronenmikroskopie

Viruskonzentration

Die virushaltige Zellsuspension von vier Rouxschalen (12. Passage, $10^{6,8}$ KID_{50}/0,1 ml) wurde nach einmaligem Einfrieren bei -70°C und Wiederauftauen zellfrei zentrifugiert (2200 x g, 10 Min.) und anschließend in der Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, L_2, 65 B) 3,5 Stunden lang bei 95.500xg (+ 4°C) ausgeschleudert. Das in 1,5 ml aqua dest. resuspendierte Pellet diente nach erfolgter niedertouriger Zentrifugation (2200 x g, 10 Min.) und anschließender Titration als Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Dichte und Elektronenmikroskopie.

Dichtebestimmung

4,5 ml einer Caesiumchloridlösung (mittlere Dichte 1,21 g/cm^3) wurden in einem Zellulosenitratröhrchen (5 ml) mit 0,5 ml Viruskonzentrat sowie abschließend mit 10 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Nach 44stündiger Zentrifugation bei 73.500xg (+ 4°C) erfolgten mittels Röhrchenpunktion die Abnahmen von 12 Fraktionen mit je 0,4 ml. Anschließend wurde in einem Refraktometer nach Abbé die Brechungsindices der Proben ermittelt und die jeweilige Dichte nach einer Eichkurve berechnet.
Zur Feststellung ihrer Infektiosität kamen die einzelnen in EARLE-Lösung 1:10 verdünnten Fraktionen sofort (ohne CsCl-Entfernung) auf FHM-Zellkulturen zur Titration.

Elektronenmikroskopie

Das Viruskonzentrat ist mit gleichen Teilen einer 2 %igen Phosphorwolframsäure (pH 7,1) gemischt worden. Anschließend kam 1 Tropfen dieser Mischung auf die vorbehandelten Trägernetze.
Die Präparate wurden mit einem Siemens Elmiskop I a unter Doppelkondensorverwendung, einer Instrumentenvergrößerung von 60.000 und einer Beschleunigerspannung von 80 KV betrachtet.

1.2.5. Ultrafiltration

Die Größenbestimmung des Isolates 10/3 erfolgte mit Millipore-Membran-Filter (Millipore GmbH, 6078 Neu Isenburg).
Nachdem die Filter - zur Vermeidung der Virusadsorption an die Membranen - mit einer unten näher beschriebenen Lösung vorbehandelt worden waren, wurden jeweils 2 ml-Proben des Isolates 10/3 (11. Passage, $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) durch Membranen mit einer Porenweite von 450 - 220 - 100 - 50 nm gegeben. Die einzelnen Filtrate kamen sofort zur Titration auf FHM-Zellkulturen.
Lösung zur Filtervorbehandlung:
200 ml einer 10 %igen Kälberserum-aqua-bidest-Lösung sind nacheinander durch die sterilisierten Membranfilter mit Porenweiten von 450 - 220 - 100 - 50 nm filtriert worden. Zum letzten Filtrat kamen, um eine Isotonie zu gewährleisten, 10 ml einer zehnfach konzentrierten EARLE-Salzlösung. Neue Membranfilter wurden durch Filtration dieser Lösung vorbehandelt.

1.2.6. Chloroformbehandlung

Die Empfindlichkeit des Isolates gegenüber dem Lipidlösungsmittel Chloroform ist nach der Methode MAYR und BÖGEL (1961) ermittelt worden. Hierzu wurde eine Probe der infektiösen Zellkulturflüssigkeit (13. Passage, $10^{7,2}KID_{50}/0,1$ ml) mit 10 % $CHCL_3$ versetzt. Eine Kontrollprobe erhielt 10 % PBS. Nachdem diese Mischungen eine Stunde lang bei + 4°C geschüttelt worden waren, verblieben sie 12 Stunden bei + 4°C. Nach erfolgter Zentrifugation (2200 x g, 30 Min.) und Abnahme der lösungsmittelfreien Phase aus der $CHCL_3$-Probe wurde diese sowie die Kontrolle getrennt auf FHM-Zellkulturen titriert.

1.2.7. pH-Empfindlichkeit

Für die Säurebehandlung ist ein aus der Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure) und Stammlösung B (0,2 M Na_2HPO_4) zusammengesetzter Puffer nach MC-ILVAINE verwendet worden.

Die gewünschten pH-Werte resultierten aus der Mischung beider Stammlösungen:

pH-Wert	Lösung A	Lösung B
3	15,89 ml	4,11 ml
7	2,61 ml	17,39 ml

10 ml der infektiösen Zellkulturflüssigkeit (11. Passage, $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) wurden zunächst gegen 1000 ml Puffer (pH- Wert 7,0) 24 Stunden lang bei + 4°C dialysiert. Nachdem anschließend ein Teil des Dialysates mit 25 Teilen des Puffers vom pH-Wert 3 bei Zimmertemperatur gemischt worden war, kamen nach 30, 60 und 120 Minuten entnommene Proben sofort zur Titration auf FHM-Zellen.
Zur Kontrolle wurden Proben des unbehandelten Ausgangsmaterials sowie des Dialysates mittitriert.

1.2.8. Wärmebehandlung

Um thermolabile Eigenschaften des Isolates 10/3 zu ermitteln, wurde die infektiöse Kulturflüssigkeit (14. Passage, $10^{6,75}KID_{50}/0,1$ ml) der Temperatur von 56°C ausgesetzt. Nach jeweils 30, 60 und 90minutiger Einwirkungszeit kamen die entnommenen Proben sofort auf FHM-Zellen zur Titration. Zur Kontrolle wurde das unbehandelte Ausgangsmaterial mittitriert.

1.2.9. Bestimmung des Nucleinsäuretypes

Für die Bestimmung des Nucleinsäuretypes wurden 2-5-Joddesoxyuridin (JUDR) und 2-5-Bromdesoxyuridin (BUDR) verwendet.
In Leighton-tubes gezüchtete FHM-Zellkulturen sind nach der Adsorptionsmethode mit 1 ml der 11. Passage ($10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) infiziert worden. Anschließend erhielt ein Teil der Kulturen je 2 ml Erhaltungsmedium mit 100 Gamma BUDR/ml, ein zweiter Teil bekam Medium mit 100 Gamma JUDR/ml und ein dritter Teil erhielt als Kontrolle Erhaltungsmedium ohne die DNS-Synthese-Hemmsubstanzen.

Zur Zelltoxizitätsprüfung der verwendeten Desoxyuridine sind nichtinfizierte Kulturen in gleicher Weise behandelt worden.
Die Kulturen wurden bei 20-22°C 72 Stunden lang inkubiert, dann bei -70°C eingefroren und wieder aufgetaut und auf FHM-Zellkulturen austitriert.
Als Kontrollviren liefen das Vaccinia-Virus (als DNS-haltiges Virus), auf embryonalen Hühnerfibroblasten und das Teschen-Virus (als RNS-haltiges Virus), auf Schweinenierenkulturen gezüchtet, mit.

2. Ergebnisse

2.1. Virusisolierung und -vermehrung in Fisch- und Warmblüterzellkulturen

2.1.1. Virusisolierung

Die Anzüchtung des vorbehandelten Originalmaterials 10/3 erfolgte in primären Schwimmblasen- und Gonadenzellkulturen des Karpfens, der Regenbogenforelle sowie in Zellen der RTG-2-Zell-Linie bei 20-22°C.

Das Agens vermehrte sich bereits in den Anzuchtspassagen in den jeweiligen Zellkulturen, wenn auch mit unterschiedlich stark ausgeprägten cytopathischen Effekten. So konnten 24 Stunden p.i. in den infizierten Karpfenzellkulturen Granulierungen und abgekugelte Zellbezirke beobachtet werden. Dieser Prozess breitete sich nach und nach auf die gesamte Kultur aus, wobei 48 Std. p.i. auf die Zellabkugelungen lokal auftretende Lysis folgte (Abb. 1+2). Die Karpfenzellkulturen wiesen 96 Stunden p.i. zu 50-75 % virusspezifische Veränderungen auf (Zellabkugelungen, Zellablösungen, Lysis); die infizierten Forellenzellkulturen und die RTG-2-Zell-Linie zeigten dagegen nur schwache cytopathische Effekte (etwa 10 %) wie Granulierungen, Zellabkugelungen und Zellablösungen.

Im histologischen Präparat (Hämatoxilin-Eosin-Färbung) wurden bei zu 60 % ausgeprägten virusspezifischen Zellveränderungen flächige Zellverbände mit unregelmäßig geformtem und teilweise vakuolisiertem Zytoplasma, deformierte Zellkerne mit grobkörnigem Chromatin und Kernwandhyperchromasie beobachtet (Abb. 3).

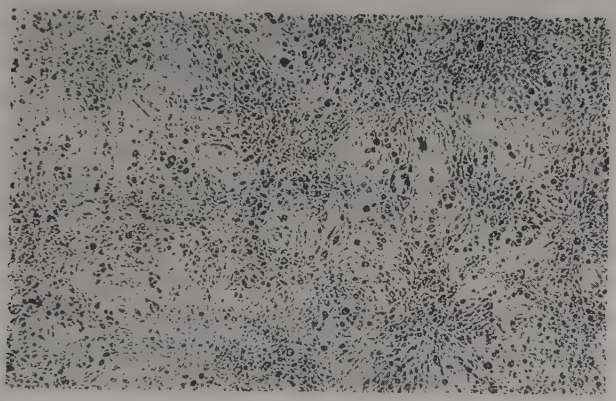

Abb. 1 Unbeimpfte FHM-Zellkultur, nativ, ca. 60 x

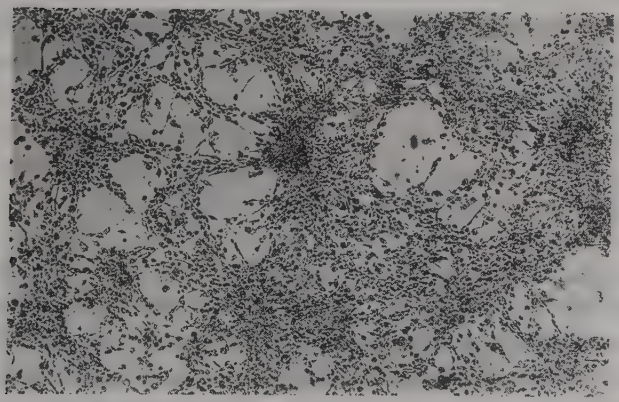

Abb. 2 Isolat 10/3 auf FHM-Zellkultur 24 Std. p.i., ausgeprägter CPE, nativ, ca. 60 x

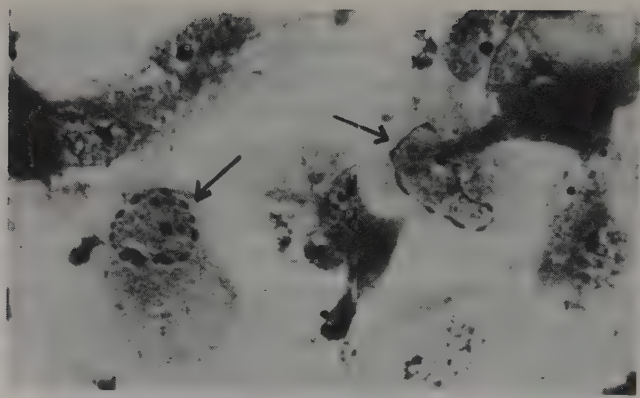

Abb. 3 Isolat 10/3 auf FHM-Zellen 24 Std. p.i., Kernwandhyperchromasie (Pfeile), HE-Färbung, ca. 1150 x

2.1.2. Virusvermehrung in Fischzellkulturen

In infizierten Primärkulturen aus Forellengewebe (Herz, Gonaden, Schwimmblase) waren 72-96 Stunden p.i. bei 20-22°C Granulierungen, cytoplasmatische Vakuolisierungen und hauptsächlich Zellabkugelungen zu beobachten. Erst mit zunehmender Passagenzahl (13. Passage) trat Lysis auf.

Mit dem Material der 12. FHM-Passage ($10^{6,8}KID_{50}/0,1$ ml) wurden auf den Forellenzellkulturen 3 Passagen durchgeführt und folgende Infektionstiter anschließend auf FHM-Zellen ermittelt (Tabelle 1):

Forellenherzzellen	$10^{4,2}KID_{50}/0,1$ ml
Forellengonadenzellen	$10^{3,2}KID_{50}/0,1$ ml
Forellenschwimmblasenzellen	$10^{3,2}KID_{50}/0,1$ ml

Die primären Karpfenzellkulturen (Gonaden, Schwimmblasen) wiesen 48 Stunden p.i. bei 20-22°C neben Granulierungen und Zellabkugelungen vereinzelte lytische Bereiche auf. Der zeitliche Ablauf des cytopathischen Effektes bis zur vollständigen Degeneration des Zellrasens verkürzte sich mit steigender Passagenzahl (2. Passage 6 Tage, 6. Passage 3 Tage). In der

6. Passage betrug die Infektionsdosis $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml bei Karpfengonaden- und $10^{6,0}KID_{50}/0,1$ ml bei Karpfenschwimmblasenkulturen (Tabelle 1).

In den RTG-2-Zellkulturen traten 4 bis 5 Tage p.i. bei 20-22°C erste virusspezifische Zellveränderungen wie Granulierungen, Vakuolisierungen und Zellabkugelungen auf. Lysis (bis 60 %) konnte beobachtet werden, wenn das Animpfmaterial gleichzeitig mit den Zellen in die Zuchtgefäße eingebracht wurde. In der 6. Passage erreichten die RTG-2-Zellkulturen einen Infektionstiter von $10^{3,8}KID_{50}/0,1$ ml (Tabelle 1).

Die FHM-Zell-Linie wurde erst ab der 11. Karpfenprimärkulturpassage verwendet. Das Isolat vermehrte sich in diesen Zellen bei 20-22°C rasch mit Zellabkugelungen, Zellablösungen und Lysis (Abb. 1+2). In der Regel war 72 Stunden p.i. der Zellkulturrasen völlig zerstört. Titer von $10^{6,5}$-$10^{7,5}KID_{50}/0,1$ ml wurden regelmäßig auf diesem Zellsystem erreicht (Tabelle 1). Wegen der raschen Adaptierung des Isolates an die FHM-Zellen, der schnellen Vermehrung und des ausgeprägten cytopathischen Effektes, wurden für die Viruscharakterisierungen ausschließlich die FHM-Zellen benutzt.

2.1.3. Virusvermehrung in Warmblüterzellkulturen

In primären Zellkulturen aus embryonalen Kälbernieren, Hühnerfibroblasten und Schweinenieren sowie in den Säuger-Zell-Linien BHK-21, Hep-2, VERO, sind mit infektiösem Material der 12. FHM-Passage ($10^{6,8}KID_{50}/0,1$ ml) jeweils 3 Passagen bei 20-22°C durchgeführt worden (Tabelle 1).
Während in der Erstpassage die virusbedingten Kulturveränderungen (Granulierungen, Abkugelungen, Zellablösungen, Lysis) zu 40-60 % bei den Hühnerfibroblasten-, Schweinenieren-, Kälbernieren- und VERO-Kulturen 72 Stunden p.i. zu beobachten waren, zeigten BHK-Zellen nach 6 Tagen und die Hep-2-Zellen erst nach 8 Tagen diese degenerativen Effekte. Bei der folgenden 2. und 3. Passage verzögerte sich gegenüber der 1. Passage das Auftreten des CPE in allen Warmblüterzellkulturen um etwa 48 bis 96 Stunden. Ermittelt wurde die jeweilige

KID_{50} auf FHM-Zellen. Sie betrug nach der 3. Zellkulturpassage in

Kälbernieren	$10^{4,8} KID_{50}/0,1$ ml
Hep-2	$10^{4,2} KID_{50}/0,1$ ml
Hühnerfibroblasten	$10^{3,8} KID_{50}/0,1$ ml
VERO	$10^{3,2} KID_{50}/0,1$ ml
Schweinenieren	$10^{1,8} KID_{50}/0,1$ ml
BHK	$10^{1,5} KID_{50}/0,1$ ml

Das infektiöse Anzuchtmaterial ist bei allen Zellverimpfungen auf Kontaminationen (Bakterien, Pilze) geprüft worden; kontaminierte Proben wurden jeweils verworfen. Mycoplasmen konnten infolge der negativen Materialverimpfungsresultate auf PPLO-Agar ausgeschlossen werden.

Tabelle 1

Auf FHM-Zellen ermittelte Infektionstiter des Isolates 10/3 nach jeweils 3 Passagen (20-22°C) auf verschiedenen Zellsystemen.

ZELLKULTUREN aus:	Kulturinfektiöse Dosis* nach 3 Passagen im jeweiligen Zellsystem
KALTBLÜTERGEWEBE	
Forellenherzzellen	4,2
Forellengonadenzellen	3,2
Forellenschwimmblasenzellen	3,2
RTG-2-Zell-Linie	3,8
Karpfenherzzellen	6,5
Karpfengonadenzellen	6,2
Karpfenschwimmblasenzellen	6,0
FHM-Zell-Linie	6,8
WARMBLÜTERGEWEBE	
Kälbernieren	4,8
Hep-2-Zell-Linie	4,2
Hühnerfibroblasten	3,8
VERO-Zell-Linie	3,2
Schweinenieren	1,8
BHK-21-Zell-Linie	1,5

* = $-\log KID_{50}/0,1$ ml

2.2. Charakterisierung des Isolates

2.2.1. Vermehrung bei verschiedenen Temperaturen

Das isolierte Agens vermehrte sich bei den Temperaturen von 4-28°C mit einem Optimum bei 20 und 22°C. Bei Temperaturen über 33°C dagegen ging die Infektiosität rasch verloren.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, wurden in einem Temperaturbereich zwischen 15 und 25°C nach 72stündiger Inkubation annähernd gleiche Infektionstiter ($10^{7,2}$-$10^{7,5}$ KID_{50}/0,1 ml) erreicht. Langsamer und mit einem um etwa 0,7 log geringerem Endwert vermehrte sich das Agens dagegen bei 28°C. Bei 4°C nahm die Infektiosität zunächst geringfügig ab, stieg aber von der 48. bis zur 72. Stunde p.i. um etwa 1,5 log auf $10^{5,5}$ KID_{50}/0,1 ml wieder an. Die bis zum Nullwert bei 33°C und 37°C abgefallenen Infektiositätstiter weisen auf thermolabile Eigenschaften des Agens hin.

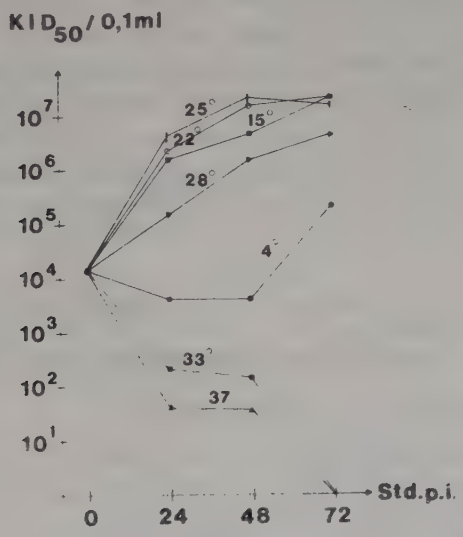

Abb. 4 Vermehrung des Isolates 10/3 auf FHM-Zellen bei verschiedenen Temperaturen

2.2.2. Einschrittvermehrungskurve

Die Einschrittvermehrungskurve des Isolates 10/3 (13. FHM-Passage, 10^{-2} KID_{50}/0,1 ml) zeigte auf die Gesamtkultur bezogen folgende Kriterien auf (Abb. 5):

Erste infektionsfähige Viruseinheiten schienen nach einer 4-stündigen Latenzzeit fertiggestellt worden zu sein. Die Virusvermehrung nahm in der Zell- (nur Zellen) und Gesamtphase (Zellen und Medium) einen ähnlichen Verlauf. In beiden Fällen stieg die Virusproduktion exponentiell an, erreichte 10 Stunden p.i. Höchsttiter von $10^{8,3}$ KID_{50}/0,1 ml und sank nach Ausbildung eines Plateaus (10. bis 16. Stunde p.i.) allmählich wieder ab. Schneller als in der Gesamtphase nahm die Infektiosität in der Zellphase ab und entsprechend dem Virusausschluß aus den Zellen stieg der Virusanteil im Medium an. 22 Stunden p.i. wurde mit $10^{7,9}$ KID_{50}/0,1 ml der Höchsttiter in der Mediumphase erreicht.

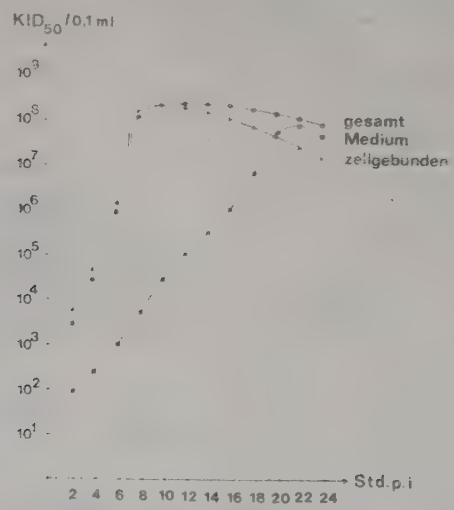

Abb. 5 Einschrittvermehrungskurve von Isolat 10/3 in FHM-Zellkulturen bei 20-22°C mit einem Infektionstiter von 5 KID_{50}/Zelle

2.2.3. Plaquebildung

Sekundärinfektionen über das Medium konnten bei den infizierten Zellkulturen durch Überschichtung mit tylosehaltigem Erhaltungsmedium ausgeschlossen werden. Der Methylzellulosezusatz beeinträchtigte weder die Infektiosität des Isolates 10/3 noch die des *Rhabdovirus carpio*; dagegen schienen gegenüber den mit tylosefreiem Medium überschichteten infizierten Zellkulturen erste CPE-Anzeichen um ca. 5 bis 8 Stunden verzögert aufzutreten. Allgemein schritt die Plaquebildung von einem inneren lytischen Herd zentrifugal diffus fort. Infolge der Zelle zu Zelle-Infektion nahm der Umfang der lytischen Herde mit der Inkubationszeit zu. Die Anzahl der Plaques in den Kulturen war vom Infektionstiter des Animpfmaterials abhängig. So wiesen die mit 10^{-1} und 10^{-2} verdünnten Virussuspensionen beimpfte Kulturen 24 bis 30 Stunden p.i. erste kleine rundliche Infektionsherde auf, die sich bereits 72 Stunden p.i. weitgehend überlappten. Dagegen konnten 72 Stunden p.i. bei den mit 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} verdünntem Animpfmaterial infizierten Kulturen makroskopisch gut sichtbare, voneinander abgetrennte Plaques im Zellrasen erzielt werden. Die Plaquemorphologie des Isolates 10/3 und die des *Rhabdovirus carpio* wies auf FHM-Zellkulturen in entsprechender Verdünnung keine erkennbaren Unterschiede auf (Tabelle 2; Abb. 6, 7 und 8).

Tabelle 2

Plaquemorphologie des Isolates 10/3 und des *Rhabdovirus carpio* auf FHM-Zellkulturen mit tylosehaltigem Erhaltungsmedium 3 Tage p.i. bei 20-22°C

	Animpfmaterial	
Plaques in FHM-Zellen	Isolat 10/3 $10^{4,0}KID_{50}/0,1$ ml	Rhabdovirus carpio $10^{3,0}KID_{50}/0,1$ ml
Größe	ca. 1 mm ø	ca. 1 mm ø
Gestalt	irregulär	irregulär
Rand	diffus	diffus
Aussehen gesamt	klar	klar
Entwicklungszeit	3 Tage	3 Tage

Abb. 6
Unbeimpfte FHM-Kontrollkultur, Kristallviolettfärbung, ca. 1,5x

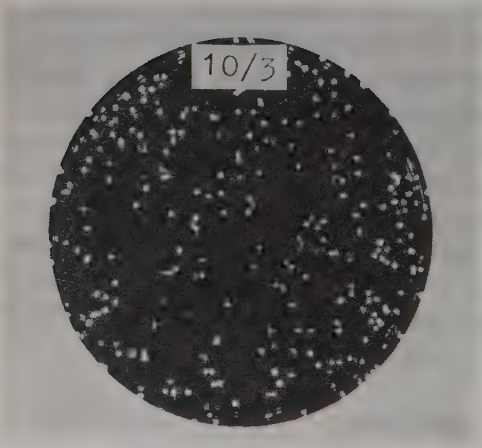

Abb. 7
Plaques des Virusisolates 10/3, $10^{4,0}$KID50/0,1 ml 72 Std. p.i., Kristallviolettfärbung, ca. 1,5x

Abb. 8
Plaques des Rhabdovirus carpio, $10^{3,0}$KID50/0,1 ml 72 Std. p.i., Kristallviolettfärbung, ca. 1,5x

2.2.4. Hämagglutination, serologische Reaktionen

Mit Erythrocyten von Meerschweinchen, Hühnern, Gänsen, Forellen, Karpfen und Menschen Gruppe O konnten bei den Temperaturen von 4°, 15°, 25° und 37°C sowie bei verschiedenen pH-Werten (pH 5-7,6) keine hämagglutinierenden Eigenschaften des Isolates 10/3 nachgewiesen werden.

Es gelang auch nicht, mit den angewandten Immunisierungsmethoden Antikörper gegen das Isolat 10/3 zu induzieren, so daß serologische Reaktionen zur Differenzierung und zum Vergleich des isolierten Virus mit anderen fisch- und säugerpathogenen Viren noch nicht durchgeführt werden konnten.

2.2.5. Tierversuche

2.2.5.1. Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.)

Die mit dem Isolat 10/3 künstlich infizierten Karpfen zeigten in der Regel 3 bis 4 Tage p.i. neben apathischem Verhalten verminderte Reflexbewegungen und wiesen in einigen Fällen Seitenlage sowie oftmals einen einseitig ausgefallenen Augendrehreflex auf. Es traten außerdem Aftervorwölbungen mit schleimigem Ausstoß und Bauchauftreibungen in Erscheinung. An drei Karpfen wurden kleinflächige Hautblutungen und Muskelpetechien beobachtet. Post mortem wiesen die infizierten Fische die Symptome einer katarrhalen Enteritis mit Ödembildung und Schleimhautveränderungen auf. Im allgemeinen waren im Gegensatz zu den Kontrolltieren folgende makroskopisch ersichtliche Veränderungen an den inneren Organen zu erkennen (Abb. 9).

Leber:	blaß oder bräunlich grün verfärbt.
Niere:	schwach vergrößert.
Milz:	vergrößert.
Herz:	Blutungen im Herzbeutel.
Darm:	Entzündungen und fädige Schleimabsonderungen.
Schwimmblase:	Gefäßdilatationen, Blutungen in der Schwimmblasenwand beider Kammern.
Bauchhöhle:	Aszitesflüssigkeit (1-3 ml).
Gehirn:	Gerötete Partien und vermehrter Liquor.

Von den in zwei Versuchsreihen (je 5 Karpfen) mit dem Isolat 10/3 (11. Passage, $10^{6,2}KID_{50}$/0,1 ml bzw. 12. Passage

$10^{6,8}KID_{50}/0,1$ ml) i.p. infizierten Tieren starben am
4. Tag p.i. 5 Karpfen,
5. Tag p.i. 1 Karpfen,
6. Tag p.i. 3 Karpfen,
8. Tag p.i. 1 Karpfen (Tabelle 3).

Die Kontrollfische blieben während der gesamten Versuchsdauer ohne Ausfälle.

Abb. 9 Schwimmblase eines mit Isolat 10/3 i.p. infizierten K_1, 6 Tage p.i. gestorben. Blutungen in der Schwimmblasenwand (Pfeile).

Tabelle 3

Mortalität der mit 2 ml i.p. des Isolates 10/3 (11. FHM-Passage, $10^{6,2}KID_{50}$/0,1 ml und 12. FHM-Passage, $10^{6,8}KID_{50}$/0,1 ml) infizierte Karpfen nach Tagen post infectionem bei einer Wassertemperatur von 14-17°C

	Karpfen Nr.	Mortalität Tage p.i. 1	2	3	4	5	6	7	8
TIERVERSUCH I									
11. FHM-Passage $10^{6,2}KID_{50}$/0,1 ml	1				+				
	2				+				
	3					+			
	4						+		
	5								+
TIERVERSUCH II									
12. FHM-Passage $10^{6,8}KID_{50}$/0,1 ml	6				+				
	7				+				
	8				+				
	9						+		
	10						+		
Kontrollfische VERSUCH I	11	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollfische VERSUCH II	14	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0

Der Virusgehalt (infektiöse Einheiten) der einzelnen Organe wurde jeweils auf FHM-Zellkulturen ermittelt (Tabelle 4).

Im ersten Tierversuch erwiesen sich alle Organe bis auf Milz, Herz und Gehirn virispositiv mit Infektionstitern zwischen $10^{2,2}$(Niere) und $10^{5,2}$(Darm)KID_{50}/0,1 ml.

Im zweiten Infektionsversuch dagegen konnte aus allen Organen das Virus reisoliert werden. Die Titer lagen zwischen $10^{3,5}$ (Gehirn) und $10^{5,8}$(Leber)KID_{50}/0,1 ml.

Die Organpools der Kontrolltiere waren in beiden Versuchsreihen negativ.

In weiteren später durchgeführten Tierversuchen konnten zwar die SBE-Symptome ebenfalls experimentell induziert werden, doch können diese Versuchsergebnisse nicht als aussagekräftig angesehen werden, da zu dieser Zeit in den verfügbaren Karpfenbeständen klinisch inapparente Virusinfektionen mit Organpooltiter von $10^{6,2-6,5}KID_{50}$/0,1 ml nachgewiesen wurden, obwohl die Karpfen äußerlich wie innerlich keinerlei pathologische Merkmale aufwiesen.

Tabelle 4

Virusgehalt der Organe von den experimentell mit jeweils 2 ml des Isolates 10/3 der 11. und 12. FHM-Zell-Passage infizierten Karpfen

	i.p. Infektion mit Isolat 10/3 der	
	11.FHM-Passage	12. FHM-Passage
Organe	KID_{50}/0,1 ml	
Leber	$10^{3,5}$	$10^{5,8}$
Niere	$10^{2,2}$	$10^{4,2}$
Milz	negativ	$10^{4,5}$
Herz	negativ	$10^{4,2}$
Darm	$10^{5,2}$	$10^{4,5}$
Schwimmblase	$10^{2,5}$	$10^{4,8}$
Muskel	$10^{3,2}$	$10^{3,8}$
Gehirn	negativ	$10^{3,5}$
Organpools der Kontrolltiere	negativ	negativ

2.2.5.2. Giebel (C a r a s s i u s a u r a t u s g i b e l i o Bl.)

Das Schwimmverhalten der mit 2 ml des Isolates 10/3 (12. Passage, $10^{6,8}KID_{50}/0,1$ ml) i.p. infizierten Giebel wies 14 Tage p.i. keine Veränderungen auf. Es konnten innerlich wie äußerlich keine pathologischen Merkmale festgestellt werden.
In keinem Falle gelang es, aus den Organpools das infektiöse Agens zu reisolieren.
Dieses Versuchsergebnis scheint die Vermutung einiger Autoren zu bestätigen, daß Giebel neben anderen Fischarten für den Erreger der Schwimmblasenerkrankung nicht empfänglich sind.

2.2.5.3. Guppy (L e b i s t e s r e t i c u l a t u s P.)

Alle im infektiösen Wasser gehaltenen Guppies starben in einem Zeitraum von 7 bis 14 Tagen p.i. Gegenüber den Kontrolltieren traten bei den infizierten Fischen eine etwas dunklere Hautfärbung sowie Rötungen im Kopf- und Kiemenbereich auf. Besonders auffällige äußere Hautblutungen wurden an einem Guppy 11 Tage p.i. beobachtet (Abb. 10). Bei den post mortem in toto verarbeiteten und auf FHM-Zellen austitrierten Fischen konnte ein durchschnittlicher Infektionstiter von $10^{4,5}KID_{50}/0,1$ ml ermittelt werden.

Abb. 10 Pathologische Veränderungen (Dunkelfärbung, Hautblutungen) an einem, über das Haltungswasser mit dem Isolat 10/3 infizierten Guppy; der Fisch starb 11 Tage p.i.
oben: infizierter Fisch unten: Kontrollfisch

2.2.6. Viruskonzentration, Bestimmung der Dichte und Elektronenmikroskopie

2.2.6.1. Viruskonzentration

Durchschnittlich konnte mittels 3,5stündiger Zentrifugation (+4°) bei 95.500xg, der Virusgehalt des Isolates 10/3 um zwei 10er Potenzen konzentriert werden. Entsprechend verblieb nach dem Ausschleudern eine um den gleichen Betrag niedrigere Restinfektiosität im Überstand zurück.

2.2.6.2. Bestimmung der Dichte

In der Caesiumchloridlösung bildete sich nach 44stündiger Zentrifugation (+4°) bei 73.500xg ein isopyknischer Gradient mit einer Dichte von 1.140 bis 1.265 g/cm^3 aus (Abb. 11). Die höchste Virusinfektiosität wurde mit einem Titer von $10^{8,4}$ KID_{50}/0,1 ml in dem Dichtebereich zwischen 1.195 und 1.200 g/cm^3 CsCl der Fraktionen 5-6 ermittelt. Dieser gefundene Wert stimmt weitgehend mit der spezifischen Dichte der Rhabdoviren überein.

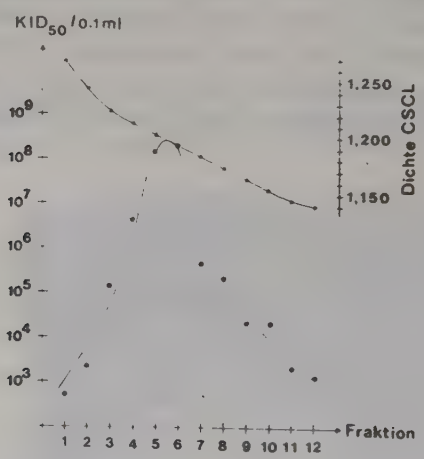

Abb. 11 Infektiosität des Isolates 10/3 in den einzelnen Fraktionen nach erfolgtem CsCl-Gradientenlauf.

2.2.6.3. Elektronenmikroskopie

Die elektronenoptische Darstellung (negative-staining) des in FHM-Zellkulturen passierten Isolates 10/3 ließ geschoßförmige Partikel, mit einem kegelförmigen und einem flachen Ende, einer durchschnittlichen Breite von 70 nm, aber mit unterschiedlichen Längen von 90-140 nm, erkennen (Abb. 12).
Im Virusinneren traten Innenkomponente von etwa 20 nm Durchmesser hervor. Die kurze, gedrungene Gestalt einiger Partikel ist wahrscheinlich auf die Präparation zurückzuführen; auch schien es, daß einige Viria durchgebrochen waren, strukturell aber glichen diese weitgehend den Rhabdoviren.

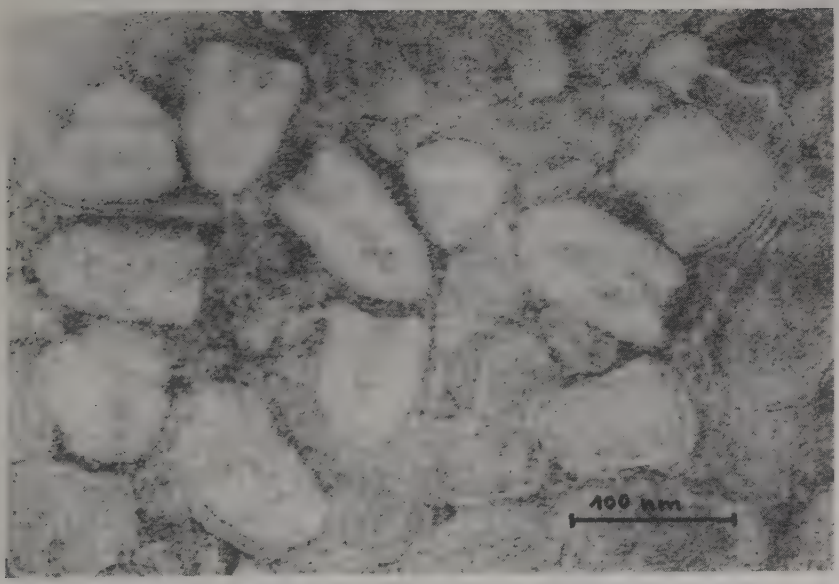

Abb. 12 Elektronenoptische Aufnahme (negative staining) von Partikeln des in FHM-Zellen vermehrten Isolates 10/3.
Elmiskop: 60 000 x
Photo: 5 x

2.2.7. Ultrafiltration

Das infektiöse Material des Isolates 10/3 (11. Passage, $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) passierte ohne signifikanten Titerverlust (nach Filterdurchgang, $10^{5,8}KID_{50}/0,1$ ml) die Membranfilter mit einer Porenweite von 450 und 220 nm. Membranen mit der Porengröße von 100 und 50 nm hielten dagegen die Partikel vollständig zurück. Das isolierte Agens ist demnach kleiner als 220 nm, aber größer als 100 nm.

2.2.8. Chloroformbehandlung

Das Isolat 10/3 (13. Passage, $10^{7,2}KID_{50}/0,1$ ml) erwies sich im Test als chloroformlabil. Die Inaktivierung durch Chloroform weist auf eine lipidhaltige äußere Hülle des Agens hin.

2.2.9. pH-Empfindlichkeit

Im Säurelabilitätstest wurde das isolierte Agens (11. Passage, $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) durch Puffer mit dem pH-Wert 3 inaktiviert (Abb. 13). Der Infektionstiter sank von dem Ausgangswert $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml

nach 30minutiger Einwirkungszeit auf $10^{2,8}KID_{50}/0,1$ ml,

nach 60minutiger Einwirkungszeit auf $10^{0,8}KID_{50}/0,1$ ml,

nach 120minutiger Einwirkungszeit auf $10^{0,2}KID_{50}/0,1$ ml.

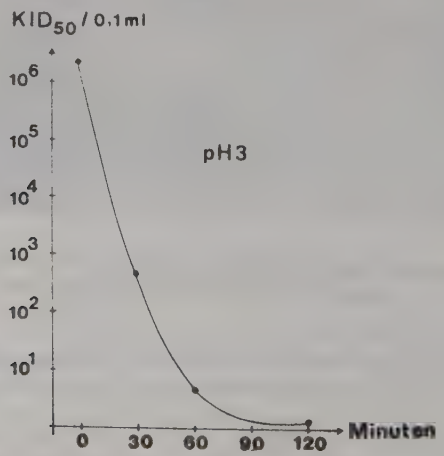

Abb. 13 Abnahme der Infektiosität des Isolates 10/3 infolge Säurebehandlung (pH 3) nach 30,60 und 120minutiger Einwirkungszeit.

2.2.10. Wärmebehandlung

Das Isolat 10/3 (14. Passage, $10^{6,75}KID_{50}/0,1$ ml) verlor durch die Temperatureinwirkung von 56°C rasch an Infektiosität. Bereits nach 30 Minuten war der Infektionstiter auf $10^{2,8}KID_{50}/0,1$ ml, nach 60 Minuten auf $10^{2,1}KID_{50}/0,1$ ml und nach 90 Minuten auf $10^{1,5}KID_{50}/0,1$ ml abgesunken.

2.2.11. Bestimmung des Nucleinsäuretypes

Die Replikationsfähigkeit des isolierten Agens (11. Passage $10^{6,2}KID_{50}/0,1$ ml) in FHM-Zellkulturen wurde weder durch IUDR noch durch BUDR signifikant beeinträchtigt. Der Infektiositätstiter des Isolates betrug nach der Desoxyuridin-Behandlung $10^{5,5}KID_{50}/0,1$ ml.

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß das isolierte Agens RNS als Nucleinsäure besitzt, welche bei den Rhabdoviren typisch ist.

Bei den Kontrollviren wurde erwartungsgemäß die Vermehrung des Vaccina-Virus (DNS-haltig) im Gegensatz zum Teschen-Virus (RNS-haltig) gehemmt. Die mit den Desoxyuridinen behandelten FHM-Kontrollkulturen wiesen keinerlei Veränderungen auf.

Tabelle 5

Tabellarische Übersicht der Infektionstiter des Isolates 10/3 vor und nach der Ultrafiltration, Chloroform-, Säure-, Desoxyuridin- und Wärmebehandlung

Virusbehandlung	Infektionstiter ($-\log KID_{50}/0,1$ ml)	
Ultrafiltration	vor Behandlung	nach Behandlung
450 nm	6,2	5,8
220 nm	6,2	5,8
100 nm	6,2	0
50 nm	6,2	0
Chloroformbehandlung	7,2	0
Säurebehandlung (pH_3)		
nach 30 Min.	6,5	2,8
nach 60 Min.	6,5	0,8
nach 120 Min.	6,5	0,2
Desoxyuridinbehandlung		
BUDR	6,2	5,5
IUDR	6,2	5,5
Wärmebehandlung		
nach 30 Minuten	6,75	2,8
nach 60 Minuten	6,75	2,1
nach 90 Minuten	6,75	1,5

D BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Ätiologie der akuten sowie der chronischen Form der Schwimmblasenentzündung der Karpfen (SBE) ist bis heute umstritten (KANAEV et al., 1963; ARSZANICA, 1966, 1968, 1969; MARKIEWICZ, 1967; KULOW und MATTHEIS, 1969; u.a.). Eine Reihe von Beobachtungen weisen jedoch auf eine Virusätiologie hin, ohne daß bisher ein sicherer Nachweis dafür erbracht werden konnte (KUDENCOVA, 1966; MARKIEWICZ, 1966 a und b; ARSZANICA, 1969; KUDENCOVA, 1969; OTTE, 1971; BRAUN, 1972; u.a.).

In den vorliegenden Untersuchungen zur Abklärung der SBE-Ätiologie konnte, im Zusammenhang mit dem Auftreten von klinischen Erscheinungen der akuten Form der SBE, ein Virus von erkrankten Karpfen isoliert werden.
Das Isolat (Versuchsbezeichnung 10/3) erwies sich bei der Charakterisierung als RNS-haltig, chloroform-, säure-(pH 3) und thermolabil (30 Min. bei 56°C). Der Infektiositätsverlust durch das Lösungsmittel Chloroform weist auf eine lipidhaltige Hülle des Agens hin. Im isopyknischen Caesiumchloriddichtegradienten wurde der Infektionspeak des Isolates 10/3 bei einer Dichte zwischen 1.195 und 1.200 g/cm^3 CsCl ermittelt. Diese Werte entsprechen weitgehend dem Dichtebereich, der für Viren der Rhabdogruppe gefunden wurde (WILNER, 1969). Nach der mit Hilfe der Ultrafiltration durchgeführten Größenbestimmung besitzt das isolierte Agens 10/3 eine Größe zwischen 100 und 200 nm. Diese Größenverhältnisse stimmen mit den im Elektronenmikroskop ermittelten Werten überein. In negativ-kontrastierten 10/3-Isolatpräparaten wurden geschoßförmige Partikel mit einem kegelförmigen und einem flachen Ende, einer durchschnittlichen Breite von 70 nm und mit Längen von 90-140 nm sichtbar. Im Virusinnern traten Innenkomponente von etwa 20 nm Durchmesser hervor.
Auf Grund der Morphologie, der Größenverhältnisse sowie der chemisch-physikalischen Eigenschaften ist das isolierte Agens in die Gruppe der Rhabdoviren einzuordnen (HUMMELER et al., 1967).

Das Virus war häufig in der Leber, Niere, Milz, Herz, Darm, Schwimmblase, Gehirn und in der Muskulatur bei Karpfen, die an der akuten Form der SBE erkrankt waren, nachweisbar. Darüberhinaus gelang es auch von Karpfen, die äußerlich gesund und ohne jegliche pathologisch-anatomischen Veränderungen waren, das Virus zu isolieren. Demnach ist auch in Fischbeständen, die ohne erkennbare Krankheitsanzeichen sind, mit der Anwesenheit des Virus zu rechnen.
Erstmals wurde das Agens aus dem Gehirn SBE-kranker Karpfen über Karpfengonadenzellkulturen isoliert. Bessere Anzuchtsergebnisse sind später mit der FHM-Zell-Linie (GRAVELL und MALSBERGER, 1965) erzielt worden. Das Virus vermehrte sich in den FHM-Zellkulturen mit einem schnell auftretenden cytopathischen Effekt und mit Höchstinfektionstitern von $10^{6,5}$-$10^{7,5}$ KID_{50}/0,1 ml. Die Vermehrungskinetik erwies sich als temperaturabhängig. Bei der Optimaltemperatur von 20-22°C betrug in der Einschrittvermehrungskurve die Dauer eines Replikationszyklusses etwa 8-10 Stunden; danach wurde das Virus schnell aus der Zelle ausgeschleust. Bei höheren (bis 28°C) und bei niedrigeren Temperaturen (4-20°C) wurde eine langsamere Virusvermehrung beobachtet. Bei 33°C und 37°C replizierte sich das Virus nicht mehr. Die Optimaltemperatur von 20-22°C läßt eine einfache Differenzierung von den bekannten fischpathogenen Rhabdoviren der Salmoniden zu, da deren optimale Vermehrungstemperaturen in einem Bereich von 10 und 15°C (WOLF, 1970) liegen. Die Optimaltemperatur des isolierten Agens 10/3 ist jedoch identisch mit den Werten, die für das R h a b d o - v i r u s c a r p i o, dem Erreger der akuten IBW des Karpfens, beschrieben wurden (FIJAN et al., 1971; FIJAN, 1972).

Überraschenderweise zeigte das Isolat 10/3 ein breitgefächertes Wirtsspektrum. Das Agens vermehrte sich, wenn auch mit geringeren Infektionstitern als in Karpfen- und FHM-Zellen, in Forellenkulturen aus Herz-, Gonaden- und Schwimmblasengewebe, in den Zellen der RTG-2-Linie, in Hühnerfibroblasten, in Mammalierzellen wie Kälber- und Schweinenieren sowie in den Zell-Linien VERO, BHK 21 und Hep-2. Ein ähnlich weites Wirtsspektrum besitzen auch verschiedene Rhabdoviren der Mammalier

wie das Tollwutvirus und das Virus der vesikulären Stomatitis (WILNER, 1969). FIJAN et al. (1971) und FIJAN (1972) berichteten über die Vermehrung des R h a b d o v i r u s c a r p i o in Forellenzellkulturen mit signifikant niedrigeren Infektionstitern als in homologen Zellsystemen.

Hämagglutinierende Eigenschaften des Isolates 10/3 gegenüber einer Reihe von verschiedenen Erythrozyten (Fisch, Geflügel, Säuger) konnten weder bei verschiedenen Temperaturen noch bei wechselnden pH-Werten nachgewiesen werden.

Plaques des Isolates 10/3 und des R h a b d o v i r u s c a r p i o (FIJAN et al., 1971) ließen hinsichtlich ihrer Entwicklungskinetik, Größe und Morphologie keine Unterschiede erkennen. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die durch Egtvedviren verursachten Plaques (de KINKELIN und SCHERRER, 1970) in Form und Größe. Ferner zeigten serologische Untersuchungen, daß das Isolat 10/3 keine antigene Beziehung zum Egtvedvirus besitzt.

Ein direkter serologischer Vergleich zwischen dem R h a b d o v i r u s c a r p i o (FIJAN et al., 1971) und dem Isolat 10/3 war noch nicht möglich, da die zahlreichen Versuche zur Herstellung eines Hyperimmunserums gegen beide Viren bisher erfolglos verliefen. Diese negativen Berichte stehen in Übereinstimmung mit Angaben von FIJAN (1972) für das R h a b d o v i r u s c a r p i o.

Nach Verimpfung des Isolates 10/3 auf gesunde Karpfen konnte das Krankheitsbild der SBE zwar in Karpfen (C y p r i n u s c a r p i o L.), nicht aber in Giebeln (C a r a s s i u s a u r a t u s gibelio Bl.) erzeugt werden.
Die Inkubationszeit war von der Virusdosis abhängig; erste Todesfälle traten jedoch bereits am 4. Tag p.i. auf.
Guppies (L e b i s t e s r e t i c u l a t u s P.) waren für das Isolat 10/3 ebenfalls empfänglich und starben unter Ausbildung pathologisch anatomischer Veränderungen etwa 7-14 Tage post infectionem.
Das Virus 10/3 konnte mit Ausnahmen aus allen Organen der infizierten Karpfen reisoliert werden, während die Organe

der Kontrollfische negativ waren.

Auf Grund der ähnlichen Krankheitsbilder (aufgetriebene Bäuche, Afterentzündungen, Peritonitis, Petechien in Niere, Leber, Pericard, Schwimmblase und Muskulatur, neuro-sensorische Symptome u.a.) des R h a b d o v i r u s c a r p i o (FIJAN et al., 1971) und des Isolates 10/3 sowie wegen übereinstimmender pathogenetischer Eigenschaften, Ausbildung ähnlicher cytopathischer Effekte (Abkugelungen und Kernwandhyperchromasien), gleichartiger Plaquemorphologien und den identischen Optimaltemperaturen kann eine Identität zwischen den beiden Viren nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl eine definitive Aussage über die Differenz beider Viren nur über einen z.Zt. noch nicht möglichen serologischen Vergleich gemacht werden kann, würde die Vermutung hinsichtlich der Ähnlichkeit oder Identität beider Viren zu dem Schluß führen, daß auch die Krankheitsformen der akuten IBW und die der akuten SBE in der Ätiologie einheitlich sind. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Beobachtungen von v.LUKOWICZ (1972), wonach die SBE neben der IBW gleichzeitig in Karpfenbeständen auftreten kann. Darüberhinaus hat OTTE (1971) auf Grund histologischer Untersuchungen festgestellt, daß zwischen der SBE und der IBW Parallelen existieren.

Mit dem Virusisolat von FIJAN et al. (1971) sowie mit dem Isolat 10/3 konnte jeweils nur die akute Form der IBW bzw. der SBE reproduziert werden. Ob die chronischen- oder Geschwürsformen, die bei beiden Krankheiten beschrieben wurden, eigenständige Krankheiten mit unterschiedlicher Ätiologie darstellen, wie FIJAN (1972) vermutet, oder ob es sich hier lediglich um Komplikationen bzw. Sekundärprozesse handelt, die mit den Rhabdovirusinfektionen einhergehen können, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde über standardisierte Methoden zur routinemäßigen Herstellung von Zellkulturen aus verschiedenem Süßwasserteleosteergewebe (Karpfen und Forelle) für die Virusanzüchtung berichtet.

2. Beste Resultate hinsichtlich Ausbeute und Anzüchtbarkeit der Zellen wurden durch das fraktionierte Dispersionsverfahren mit 0,25 %iger Trypsin-PBS-Lösung sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C erzielt. Die Zellausbeute betrug bei Gonaden-, Schwimmblasen- und Herzgewebe von Forellen durchschnittlich $1-5x10^7$, $8-10x10^6$ und $2-4x10^6$ bzw. von Karpfen $1-5x10^7$, $1-3x10^7$ und $1-3x10^6$ Zellen pro Fisch.

3. Mit einer Zelleinsaatmenge von $2-10x10^5$ Zellen/ml ließen sich regelmäßig Gonaden-, Schwimmblasen-, teilweise auch Herzzellen von Forellen bei 20-22°C (Optimaltemperatur 22°C) von Karpfen bei 25-28°C (Optimaltemperatur 28°C) anzüchten.

4. Die Zellen vermehrten sich mit verschiedenen unverdünnten Mammalierzellkulturmedien wie TC 199, L_{15}, EAGLE's minimal essential Medium in den Salzlösungen nach HANKS und EARLE ohne signifikante Unterschiede. Als Mediumzusatz hat sich Kälberserum, vornehmlich fötales in 10-20 %iger Konzentration bewährt.

5. Ohne sichtbare Unterschiede wuchsen die Zellen in einem pH-Bereich von 6,6-7,9. Die Verwendung von organischen Puffern (EAGLE, 1971) im Kulturmedium erbrachten gegenüber den $NaHCO_3$-gepufferten Medien hinsichtlich der pH-Stabilität sowie der Zellvermehrungsrate keine Vorteile.

6. Forellenzellen konnten bei 4°C über 120 Tage, Karpfenzellen bis zu 30 Tage in einem guten Zustand aufbewahrt werden. Die Überlebensquote der mit DMSO-haltigen Medien bei -70°C eingefrorenen Zellen betrug maximal 12 %. Dagegen waren von den bei -70°C eingefrorenen Geweben dispergierten Zellen etwa

25 % überlebensfähig. Ohne Beeinträchtigung der Anzuchtsergebnisse konnten Fische post mortem bis zu 48 Stunden bei 4°C für einen Kulturansatz aufbewahrt werden.

7. Weiterhin wurden die Isolierung und die Eigenschaften des mutmaßlichen Erregers der akuten Schwimmblasenentzündung (SBE) der Karpfen beschrieben.

8. Der Erreger erwies sich als RNS-haltig und wurde durch eine Chloroform-, Säure- und Wärmebehandlung rasch inaktiviert. Im isopyknischen Caesiumchlorid-Dichte-Gradienten wurde eine Dichte zwischen 1.195-1.200 g/cm^3 CsCl ermittelt. Die Morphologie (geschoßförmig, mit einem kegelförmigen und einem flachen Ende, einer Innenkomponente von etwa 20 nm Durchmesser) und die Größe von 70x90-140 nm lassen eine Zuordnung des isolierten Agens zur Rhabdovirusgruppe zu.

9. Das Isolat vermehrte sich in Karpfenzellkulturen, in Zellen der FHM-Zell-Linie und mit signifikant niedrigeren Infektionstitern auch in Forellen- sowie in verschiedenen Warmblüterzellkulturen bei Temperaturen von 4-28°C mit einer Optimaltemperatur von 20-22°C.

10. Nach Verimpfung des Isolates auf gesunde Karpfen konnte das Krankheitsbild der SBE reproduziert werden. Die Mortalität betrug nach der experimentellen Infektion 100 %. Das Isolat unterschied sich auf Grund der Vermehrungstemperatur, der Plaquemorphologie und -größe sowie der pathologisch anatomischen Erscheinungen vom Egtved-Virus. Im Gegensatz hierzu wurden zwischen dem Isolat 10/3 und dem R h a b d o - v i r u s c a r p i o, dem Erreger der akuten Form der IBW, eine Reihe von physikalischen und biologischen Übereinstimmungen beobachtet. Auf Grund der Ähnlichkeiten zwischen den beiden Erregern wird die Ätiologie der akuten Form der SBE und der IBW diskutiert.

SUMMARY

1. Standardized methods for the routine production of cell cultures from different teleost tissues of fresh water fish (carp and trout) are described.

2. Best results were obtained by fractionated dispersion with 0.25 % trypsin-PBS-solution at room temperature and at 4°C. The cell yield was with gonades, swimmbladder and heart tissues of trout on the average $1-5x10^7$, $8-10x10^6$ and $2-4x10^6$, of carp $1-5x10^7$, $1-3x10^7$ and $1-3x10^6$ cells per fish. Other tissues could not be cultivated.

3. The optimal number of cells for initiation of cultures was $2-10x10^5$ and at temperatures of 20-22°C for trout (optimal temperature 22°C) and 25-28°C for carp (optimal temperature 28°C) cells grew best.

4. Cells grew in different undiluted culture media normally employed for mammalian cell cultures like TC 199, L_{15}, Eagles minimal essential medium (MEM) with basal salt solutions according to Earle and Hanks without significant differences. Fetal calf serum-concentrations of 5-20% gave best results as additive.

5. No differences were observed in cell growth in pH ranges between 6,6 and 7,9. The use of organic buffers (EAGLE, 1971) in the media was not superior to the $NaHCO_3$-buffered media.

6. Trout cellmonolayer cultures could be kept in good condition at 4°C for 120 days, carp cell cultures for up to 30 days. The viability of cells frozen and stored at -70°C was only 12 %. On the other hand cells trypsinized from organs frozen and stored at -70°C showed about 25 % viability. Fish could be kept up to 48 hours p o s t m o r t e m without significant losses in cell yield or viability.

7. Furthermore the isolation and properties of a virus are described, which occurred in carp with infections swimbladder disease.

8. The agent is a RNA-containing virus that is labile to treatment with chloroform, acid and heat. It banded at a dendisity of 1.195-1.200 g/cm^3 in cesium chloride gradients. The morphology of the particles and the size of 70x90-140 nm showed it to belong to the rhabdovirus group.

9. The virus replicated in cell cultures from carp, in the cell line FHM and with significant lower titers in cells of trout and mammalian origin at temperatures of 4-28°C (optimum 20-22°C).

10. After inoculation of the virus into healthy carps a disease similar to the swimbladder inflammation was produced. The Mortality was 100 %. The isolated agent could be differentiated from the Egtved-virus by its replication temperature, plaque morphology and in size and pathological apperearances. There was a striking similarity between the isolate and the R h a b d o v i r u s c a r p i o, the virus of spring viremia of carps.

V. LITERATURVERZEICHNIS

A zu: Die Züchtung von Zellkulturen aus Fischgewebe

ASHWOOD-SMITH, M.J., 1961: Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulphoxide. Nature, 190, 1204.

BABINI, A., und GHITTINO, P., 1961: Coltivaziene in vitro in monostrato di tessuti di pesci. Atti.Soc.Ital.Sci.Vet., 15, 456.

BACHMANN, P.A., 1970: Die Verwendung von Zellkulturen bei der Erforschung menschen- und tierpathogener Virusarten. Med.vet.Habilitationsschrift, München.

BARGEN, G., und WESSING, A., 1960: Lebendbeobachtungen an in vitro kultivierten Fischzellen. Z.wiss.Mikroskop.u.mikroskop.Techn. 64, 356.

BEASLEY, A.R., SIGEL, M.M., und CLEM, L.W., 1966: Latent infection in marine fish cell tissue cultures. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 121, 1169.

BEASLEY, A.R., und SIGEL, M.M., 1968: Interferon production in cold-blooded vertebrates. In Vitro, 3, 154.

BEHRENS, F., und MAULER, R., 1970: Die Technik der Darstellung von Chromosomen aus weißen Blutzellen. Blut, 21, 51.

BLACK, V.S., 1957: Excretion and osmoregulation. In "The Physiology of Fishes", M.E. Brown, ed., Vol.I.pp. 163, Academic Press,New York.

BULLOUGH, W.S., 1962: The control of mitotic activity in adult mammalian tissue. Biol.Rev., 37, 307.

BULLOUGH, W.S., 1963: Analysis of the life-cycle in mammalian cells. Nature, 199, 859.

CHLOPIN, N.G., 1925: Studien über Gewebekulturen im artfremden Blutplasma:
I. Allgemeines.
II.Das Bindegewebe der Wirbeltiere.
Z.Mikroskop.-Anat.Forsch., 2, 324.

CHLOPIN, N.G., 1928: Gewebskultur niederer Vertebraten.
Arch.exp.Zellforsch., 6, 97.

CLEM, L.W., MOEWUS, L., und SIGEL, M.M., 1961: Studies with cells from marine fish in tissue culture.
Proc.Soc.exp.Biol.Med., 108, 762.

CLEM, L.W., SIGEL, M.M., und FRIIS, R.R., 1965: An orphan virus isolated in marine fish cell tissue culture.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 343.

DEDERER, P.H., 1921: The behavior of cells in tissue cultures of Fundulus heteroclitus with special reference to the ectoderm.
Biol.Bull., 41, 221.

DEVILLERS, C., 1947: Explantations in vitro de blastodermes de Poissons (Salmo, Esox).
Experientia, 3, 71.

DOUGHERTY, R.M., 1962: Use of dimethyl sulphoxide for preservation of tissue culture cells by freezing.
Nature, 193, 550.

DULBECCO, R., 1952: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.
Proc.nat.Acad.Sci., 38, 747.

DULBECCO, R., und VOGT, M., 1954: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J.exp.Med., 99, 167.

EAGLE, H., 1955: Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture.
Science, 122, 501.

EAGLE, H., 1959: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science, 130, 432.

EAGLE, H., 1971: Buffer combinations for mammalian cell cultures.
Science, 174, 500.

EAGLE, H., HORTON, C.L., und FLEISCHMANN, R., 1956: The growth response of mammalian cells in tissue culture to l-glutamine and l-glutamicacid.
J.biol.Chem., 218, 607.

EARLE, W.R., 1934: A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in carrel flasks.
Arch.exp.Zellforsch., 16, 116.

EASTY, G.C. und MUTOLO, V., 1960: The nature of the intercellular material of adult mammalian tissue.
Exp.Cell.Res., 21, 374.

FEDOROFF, S., 1966: Proposed usage of animal tissue culture terms.
In Vitro, 2, 155.

FLOREY, E., 1966: An introduction to general and comparative animal physiology,
1.ed.W.B. Saunders Company, Philadelphia/ London, 69.

FRYER, J.L., 1964: Methods for the in vitro cultivation of cells from the tissues of salmonid fishes.
Ph.D.Thesis, Oregon State University.

FRYER, J.L., Yusha, A., und PILCHER, K.S., 1965: The in vitro cultivation of tissue and cells of pacific salmon and steelhead trout.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 566.

GHITTINO, P., 1961: Caratteri morfologici e biologici dei macrofagi in colture di centri nervosi di pesci.
Atti.Soc.Ital.Sci.Vet., 15, 462.

GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., und CONNOLLY, T.N., 1966: Hydrogen Ion puffers for biological research.
Biochemistry, 5, 467.

GOODRICH, H.B., 1924: Cell behavior in tissue cultures.
Biol.Bull., 46, 252.

GRAND, C.G., und CAMERON, G., 1948: Tissue culture studies of pigmented melanomas: Fish, mouse, and human. (Special Publ.)
Ann.N.Y.Acad.Sci., 4, 171.

GRAND, C.G., GORDON, M., und CAMERON, G., 1941: Neoplasm studies VIII. Cell types in tissue culture of fish melanotic tumors compared with Mammalian melanomas.
Cancer Res., 1, 660.

GRAVELL, M., und MALSBERGER, R.G., 1965: A permanent cell line from the Fathead Minnow (P i m e p h a l e s p r o m e l a s).
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 555.

GREENBERG, S.S., KOPAC, M.J., und GORDON, M., 1956: Cytology and cytochemistry of melanoma cells.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 67, 55.

GREENE, A.E., GOLDNER, H., und CORIELL, L.L., 1966: The species identification of poikilothermic tissue culture cells by the cytotoxic antibody test.
Growth, 30, 305.

GRÜTZNER, L., 1956 a: Versuche zur Züchtung des Gewebes von M a c r o p o d u s o p e r c u l a - r i s (Linné) und L e b i s t e s r e t i c u l a t u s (Peters) i n v i t r o.
Zbl.Bakt.I.Orig., 165, 8.

GRÜTZNER, L., 1956 b: Überprüfung einiger Anwendungsmöglichkeiten der Gewebekultur von Lebistes reticulatus (Peters) und Macropodus opercularis (Linné) in der Virusforschung.
Zbl.Bakt.I.Orig., 165, 81.

GRÜTZNER, L., 1958: In vitro - Züchtung des Leber- und Nierengewebes von Tinca vulgaris Cuv. (Schleie) in trypsinierten Einschichtgewebekulturen.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig., 173, 195.

HANKS, J.H., 1948: The longevity of chick tissue cultures without removal of medium.
J.Cell.Comp.Physiol., 31, 235.

HANKS, J.H., 1955: Balanced salt solutions, inorganic requirements and pH control.
In: An introduction to cell and tissue culture.
Ed. von W.F. Scherer, 1.ed.
The Burgess Publishing Co., Minneapolis.

HARRISON, R.G., 1907: Observations on the living developing nerve fibre.
Proc.Soc.exp.Biol.Med., 4, 140.

HARRISON, R.G., 1910: The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement.
J.exp.Zool., 9, 787.

HECKMANN, J.R., ALLENDORF, I.W., und WRIGHT, J.E., 1971: Trout Leukocytes: Growth in Oxygenated Cultures.
Science, 173, 246.

HU, F., und CHAVIN, W., 1960: Hormonal stimulation of melanogenesis in tissue culture.
J.Invest.Dermatol., 34, 377.

JENSEN, M.H., 1963: Preparation of fish tissue cultures for virus research.
Bull.Off.Intern.Epizoot., 59, 131.

KIM, K., und TCHEN, T.T., 1963: Studies on ACTH-induced melanocyte formation in cultures of goldfish caudal fin.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 100, 708.

KLEEMANN, K.T., FRYER, J.L., und PILCHER, K.S., 1970: Observed differences in CO_2 requirements between Mammalian and salmonid fish cell lines.
J.Cell Biol., 47, 796.

KUNST, L., 1961: Kultura bubreznog tkiva sarana. (Culture of kidney tissue of carp. Translation by Dr.N.Fijan).
Vet.Arhiv, 31, 241.

KUNST, L., 1962: Kultura bubreznih stanica sarana. (Culture of carp kidney cells. Translation by Dr.N.Fijan).
Vet.Arhiv, 32, 121.

KUNST, L., und FIJAN, N., 1966: Preparation of primary monolayer cell cultures of carp ovary.
Vet.Arhiv, 36, 235.

LEIBOVITZ, A., 1963: A medium for the growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with the atmosphere.
Am.J.Hyg., 78, 173.

LEVAN, A., NICHOLS, W.W., PELUSE, M., und CORIELL, L.L., 1966: The stemline chromosomes of three cell lines representing different vertebrate classes.
Chromosoma, 18, 343.

LEVINTOW, L., und EAGLE, H., 1961: Biochemistry of cultured mammalian cells.
Ann.Rev.Biochem., 30, 605.

LEWIS, M.R., 1916: Sea water as a medium for tissue culture.
Anat.Record, 10, 287.

LEWIS, M.R., und MAC NEAL, P.S., 1935: A study of the pituitary gland of certain fishes by means of tissue cultures.
Bull.Mt.Desert Isl.Biol.Lab., 37, 14.

LI, M.F., und JORDAN, C., 1969: Factors affecting Rainbow Trout ovary cells cultivated i n v i t r o.
J.Fish.Res.Bd.Can., 26, 461.

LI, M.F., und STEWART, J.E., 1965: A quantitative study of the effects of naturally occurring supplements on the growth of rainbow trout (S a l m o g a i r d n e r i) gonadal cells.
Can.J.Microbiol., 11, 9.

LOCKWOOD, A.P.M., 1961: "Ringer" solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition.
Comp.Biochem.Physiol., 2, 241.

LOUD, A.V., und MISHIMA, Y., 1963: The induction of melanization in goldfish scales with ACTH, i n v i t r o.
J.Cell Biol., 18, 181.

LUEKEN, W., und FOERSTER, W., 1969: Chromosomenuntersuchungen bei Fischen mit einer vereinfachten Zellkulturtechnik.
Zool.Anz., 183, 169.

MAITLAND, H.B., und MAITLAND, M.C., 1928: Cultivation of vaccinia virus without tissue culture.
Lancet 2, 215, 596.

MARKUS, P.I., CIECIURA, S.J., und PUCK, T.T., 1956: Clonal growth i n v i t r o of epithelial cells from normal human tissues.
J.exp.Med., 104, 615.

McFALLS, F.D., MARKEE, J.E., und WILBANK, G.D., 1967: The culture of adult and embryonic fish tissues.
In Vitro, 3, 196.

MERCHANT, D.J., KAHN, R.H., und MURPHY, W.H., 1964: "Handbook of Cell and Organ Culture". 2nd ed. Burgess, Minneapolis, Minnesota.

MERYMAN, H.T., 1957: Physical limitations of rapid freezing method. Proc.roy.Soc.Biol., 147, 452.

MERYMAN, H.T., 1960: General Principles of freezing and freezing injury in cellular materials. Ann.N.Y.Acad.Sci., 85, 503.

MERYMAN, H.T., 1962: Freezing of living cells. Biophysical considerations. Nat.Cancer Inst.Mon., 7, 1.

METZGER, J.F., FUSILLO, M.H., CORNMAN, I., und KUHNS, D.M., 1954: Antibiotics in tissue culture. Exp.Cell Res., 6, 337.

MONTES de OCA, H., PROBST, P., und GRUBBS, R., 1971: High-Yield Method for Dispersing Simian Kidneys for Cell Cultures. Appl.Microbiol., 21, 90.

MORGAN, J.F., MORTON, H.J., und PARKER, R.C., 1950: Nutrition of animal cells in tissue culture I. Initial studies on a synthetic medium. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 73, 1.

MOSCONA, H., und MOSCONA, A., 1952: The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. J.Anat., 86, 287.

OPPENHEIMER, J.M., 1935: The development of isolated blastoderms of Fundulus heteroclitus. J.exp.Zool., 72, 247.

OSADCAJA, E.F., 1964: Vyldelenie tsitopatogennykh agentov ot karpov pri ostroi forme krasnukhi. (Isolation of cytopathic agents from carp with acute form of rubella. Translation by Dr.N.Fijan). Veterinarija, 41, 29.

OSOWSKI, H., 1914: Über aktive Zellbewegung im Explantat von Wirbeltierembryonen.
Arch.Entwicklungsmech., 38, 547.

PFEIFFER, H., 1935: Versuche über die Deformation kleiner Lymphozyten und Retikulumzellen aus der i n v i t r o kultivierten Milz von Petromyzon fluviatilis.
Arch.exp.Zellforsch., 17, 456.

PFITZNER, I., 1964: Fischgewebekulturen und ihre Anwendungsmöglichkeiten bei der Erforschung von Fischviruserkrankungen.
Verhandl.Dtsch.Ges.Zool., Vortr. 32, 387.

PFITZNER, I., 1965: Cell and tissue culture of fresh water fish in virus research.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 547.

PFITZNER, I., 1966: Beitrag zur Ätiologie der "Haemorrhagischen Virusseptikaemie der Regenbogenforellen".
Zbl.Bakt.I.Orig., 201, 306.

PFITZNER, I., und FROEHLICH, B., 1966: Trypsinierte Einschichtgewebekulturen von Süßwasserteleosteer-Gonadenzellen.
Zbl.Bakt.I.Orig., 201, 186.

PFITZNER, I., und GRÜTZNER, L., 1964: I n v i t r o - Züchtung des Gonaden- und Schwimmblasengewebes von T i n c a v u l g a r i s Cuv. (Schleie) in trypsinierten Einschichtgewebekulturen.
Zbl.Bakt.I.Orig., 191, 474.

PILCHER, K.S., KLEEMAN, K.T., und FRYER, J.L., 1968: Growth and glycolysis in two cell lines derived from embryos of salmonid fish.
Proc.Soc.exp.Biol.Med., 127, 659.

PLUMB, J.A., und WOLF, K., 1969: Temperature and seeding density: Effects on growth rates of RTG-2-cells.
In Vitro, 4, 125.

PLUMB, J.A., und WOLF, K., 1971: Fish cell growth rates: Quantitative comparison of RTG-2-cell growth at 5-25°C. In Vitro, 7, 42.

PORTERFIELD, J.S., und ASHWOOD-SMITH, M.J., 1962: Preservation of cells in tissue culture by glycerol and dimethylsulfoxid. Nature, 193, 548.

POST, A., 1965: Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süßwasser-Teleosteern. Z.Zool.Syst.Evol., 3, 47.

RACHLIN, J.W., PERLMUTTER, A., und SEELEY, R.J., 1967: Monolayer culture of gonadal tissue of the zebra danio Brachydanio rerio. Progr.Fish Cult., 29, 232.

REICHENBACH-KLINKE, H.H., 1970: Grundzüge der Fischkunde. 1. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

ROBERTS, F.L., 1964: A chromosome study of twenty species of centrarchidae. J.Morphol., 115, 401.

ROBERTS, F.L., 1966: Cell culture of fibroblasts from Clupea harengus gonads. Nature, 212, 1592.

ROBERTS, F.L., 1967: Chromosome cytology of the osteichthyes. Progr.Fish Cult., 29, 75.

SANDERS, M., und SORET, M.G., 1954: Cultivation of animal viruses in embryonic teleost cells. Trans.N.Y.Acad.Sci., 17, 19.

SCHERER, W.F., 1960: Effect of freezing speed and glycerol concentration on 4-5 year survival of Hela and L cells. Exp.Cell Res., 19, 176.

SCHLIEPER, C., 1965: Praktikum der Zoophysiologie. 3.Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

SCHLUMBERGER, H.G., 1949: Cutaneous leiomyoma of goldfish. I. Morphology and growth in tissue culture. Am.J.Pathol., 25, 287.

SCHWARZACHER, A.G., und WOLF, U., 1970: Methoden der medizinischen Cytogenetik. 1. Aufl. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York.

SORET, M.G., und SANDERS, M., 1954: I n v i t r o method for cultivating eastern equine encephalomyelitis virus in teleost embryos. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 87, 526.

TAKAOKA, T., und KATSUTA, H., 1962: Acceleration of cell alteration by ethylen diamine tetraacetic acid (EDTA) in tissue culture. Jap.J.exp.Med., 32, 65.

TCHEN, T.T., AMMERAAL, R.N., KIM, K., WILSON, C.M., CHAVIN, W., und HU, F., 1963: Studies on the hormone-induced differentiation of melanoblasts into melanocytes in explants from xanthic goldfish tailfin. Nat.Cancer Inst.Monograph, 13, 67.

TOMASEC, I., BRUDNJAK, Z., FIJAN, N., und KUNST, L., 1964: Weiterer Beitrag zur Aetiologie der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens. Jugoslav.Akad.Znanosti i Umjetnosti, Zagreb, Mat.-Pirodoslovni Ruzred, 16, 35.

TOWNSLEY, P.M., WIGHT, H.G. und SCOTT, M.A., 1963: Marine fish tissue culture. J.Fish.Res.Bd.Can., 20, 679.

URIST, M.R., und VAN DE PUTTE, K.A., 1967: Comparative biochemistry of the blood of fishes: Identification of fishes by the chemical composition of serum. In, "Sharks, Skates and Rays" (P.W. Gilbert, R.F. Mathewson, and D.P. Rall, eds.), pp. 271, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.

WATSON, M.S., 1966: "Bibliography on Tissue Cultures: Invertebrates and Coldblooded Chordates", Misc.Publ. 10. Dept. of the Army, Ft.Detrick, Frederick, Maryland.

WATSON, M.S., und GILFORD, J.H., 1967: "Bibliography on Tissue Cultures: Invertebrates and Coldblooded Chordates", Misc.Publ. 10. Suppl. I. Dept. of the Army, Ft. Detrick, Frederick, Maryland.

WINGFIELD, W.H., 1968: Characterization of the Oregon sockeye salmon virus. Ph.D.Thesis, Oregon State University.

WOLF, K., 1956: The cause and control of blue-sac disease. Ph.D.Thesis, Utah State University.

WOLF, K., 1963: Physiological salines for freshwater teleosts. Progr.Fish Cult., 25, 135.

WOLF, K., 1965: Some recent developments and applications of fish cell and tissue culture. Progr.Fish Cult., 27, 67.

WOLF, K., 1966: The fish viruses. In: Advances in virus research, 12, 35. K.M. Smith, M.A. Lauffer ed. Academic Press, New York.

WOLF, K., und DUNBAR, C.E., 1957: Cultivation of adult teleost tissues i n v i t r o. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 95, 455.

WOLF, K., und DUNBAR, C.E., 1958: An Explantation of the Principles and Methods of Tissue Culture. Progr.Fish Cult., 20, 3.

WOLF, K., und QUIMBY, M.C., 1962: Established Eurythermic Line of Fish Cells i n v i t r o. Science, 135, 1065.

WOLF, K., und QUIMBY, M.C., 1967: Low-temperature incubation using a water supply. Appl.Microbiol., 15, 1501.

WOLF, K., und QUIMBY, M.C., 1969 a: Progress report on i n v i t r o culture of cyclostome and elasmobranch cells and tissues. In Vitro, 4, 125.

WOLF, K., und QUIMBY, M.C., 1969 b: Fish cell and tissue culture. In: Fish Physiology, Vol.III, Chapter 5, pp.253. W.S. Hoar and D.J. Randall (eds.) Academic Press, New York.

YONGNER, J.S., 1954: Monolayer Tissue Cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 85, 202.

YOUNG, J.Z., 1933: The preparation of isotonic solutions for use in experiments with fish. Pubbl.Staz.Zool.Napoli, 12, 425.

B zu: Untersuchungen über die Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen

AMEND, D.F., und CHAMBERS, V.C., 1970: Morphology of certain viruses of salmonid fishes. I. In vitro studies of some viruses causing hematopoietic necrosis. J.Fish.Res.Bd.Can., 27, 1285.

AMLACHER, E., 1958: Pathologische Histologie und Histochemie der Leber normaler und an infektiöser Bauchwassersucht erkrankter Karpfen (K_2). Arch.Fischereiwiss., 9, 97.

ANTYCHOWICZ, J., 1972: Experience paper (Nr. 31) on swim-bladder inflammation of cyprinids. In: Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Organized by FAO/EIFACH with the support of OIE, Amsterdam, 21 March, 1972.

ANTYCHOWICZ, J., und ROSZKOWSKI, J., 1971: Histopathological change in carp swim-bladder disease. Riv.It.Piscic.Ittiop., 6, 5.

ARSZANICA, N.M., 1965: Priznaki bolezni plavatielnogo puzyrja u karpov. (Symptome der Schwimmblasenerkrankung der Karpfen). Veterinarija, 42, 71.

ARSZANICA, N.M., 1966: Ustojczivost ropszinskogo gibrida k bolezni plavatielnogo puzyrja. (Die Widerstandskraft der Ropsa-Hybriden gegenüber der Schwimmblasenerkrankung). Rybovod. Rybolov., 9, 21.

ARSZANICA, N.M., 1969: Materialy po epizootiologii, diagnostikie i profilaktikie bolezni plavatielnogo puzyrja karpa. (Angaben über die Epizootie, Diagnostik und Prophylaxe der Schwimmblasenerkrankung der Karpfen). Izv.Gos.Niorch, 69, 15.

ARSZANICA, N.M., BAUER, O.N., und VLADIMIROV, V.L., 1969: Air bladder disease of carps: its aetiology, epizootiology and control. Bull.Off.int.Epiz., 69, 999.

ARSZANICA, N.M., und BAUER, O.N., 1972: Experience paper (Nr. 16) on Epizootiology, Diagnosis and Prophylaxis of swim-bladder inflammation of cyprinids.
In: Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Organized by FAO/EIFAC with the support of OIE, Amsterdam, 29 February, 1972.

ARSZANICA, N.M., GEWKAN, J., JWASIK, W., KARPENKO, J., SWIREPO, B., und FEDUSZCZAK, M., 1968: O schorzeniu pecherza pawnego karpi. (Über die Schwimmblasenerkrankung des Karpfens).
Gospodarka rybna, 20, 3.

BECKMAN INSTRUMENTS GMBH, 1962: Eine Einführung in die Dichtegradienten-Zentrifugation.
München.

BRAUN, F., 1969: Organschäden schwimmblasenerkrankter Karpfen.
Tierärztl.Wschr., 82, 173.

BRAUN, F., 1971: Histologische Untersuchungen an bauchwassersuchtkranken Karpfen.
In: "Die IBW", Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei-, und Flußbiologie, Hrsgb.Prof.Dr.Dr.h.c.H. Liebmann, 20, 44. Verlag Oldenbourg, München-Wien.

BRAUN, F., 1972: Experience paper (Nr. 24) in swimbladder inflammation of carps.
In: Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Organized by FAO/EIFAC with the support of OIE, Amsterdam, 11 March, 1972.

CHARLWOOD, P.A., 1966: Density-gradient separations in the ultracentrifuge.
Brit.Med.Bull., 22, 121.

FAKTOROVICH, K.A., 1969: Histological methods of diagnosis of Carp Dropsy.
Bull.Off.int.Epiz., 69, 1481.

FIJAN, N.N., 1966: Experimental transmission of infectious dropsy of carp.
Bull.Off.int.Epiz., 65, 731 .

FIJAN, N.N., 1972: Infectious dropsy in carp a disease complex.
In: "Diseases of Fish". Symposia of The Zoological Society of London, 30, 39. Academic Press, London-New York.

FIJAN, N.N., PETRINEC, Z., SULIMANOVIC, D., und ZWILLENBERG, L.O., 1971: Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp.
Vet-Arhiv, Zagreb, 41, 125.

GHITTINO, P., 1969: Una nuova misteriosa malattia epizootica, l'infiammazione della vescica natatoria (IVN) della carpa minaccia di invadere le carpicolture europee.
Riv.It.Piscic.Ittiopat., 4, 93.

GONCHAROV, G., 1965: Rubella, a viral Fish Disease.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 598 .

GRAVELL, M., und MALSBERGER, R.G., 1965: A permanent cell line from the fathead minnow (Pimephales promelas).
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 555.

GRISZCZENKO, L., 1966: Patologoanatomiczeskije izmienienia pri vospalenii plavatielnogo puzyrja u siegoletkov karpa. (Pathologisch-anatomische Veränderungen nach Schwimmblasenentzündung bei einsömmrigen Karpfen).
Rybovod.Rybolov., 9, 20.

HAVELKA, J. und VOLF, Fr., 1969: Problematik der Diagnose der IBW vom Standpunkt des Krankheitserregers aus.
Bul.VUR Vodnany, 3, 19.

HEUSCHMANN-BRUNNER, G., 1965: Ein Beitrag zur Erregerfrage der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens.
Allg.Fischerei-Ztg., 90, 41.

HEUSCHMANN-BRUNNER, G., 1971: Einige Bemerkungen aus bakteriologischer Sicht zu dem Thema "Infektiöse Bauchwassersucht des Karpfens." In: "Die IBW", Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei-, und Flußbiologie. Hrsgb.Prof.Dr.Dr.h.c.H. Liebmann, 20, 67. Verlag Oldenbourg, München-Wien.

HOFER, B., 1904: Handbuch der Fischkrankheiten. Verlag der Allg. Fischerei-Ztg., München.

HUMMELER, K., KOPROWSKI, H., und WIKTOR, T.J., 1967: Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture. J.Virol., 1, 152.

JAHNEL, J., 1938: Beiträge zur Kenntnis der Schwimmblasenentzündung der Fische. Virchows Arch.path.Anat.Physiol., 302, 162.

KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakologie, 162, 480.

KANAEV, A.J., 1968: Etat présent et perspectives de l'étude de l'Inflammation de la vessie natatoire chez les carpes. In: III Symposium de la Commission de l'Office International des Epizooties pour l'Etude des Maladies des Poissons. Stockholm, 23-27 septembre, 1968.

KANAEV, A.J., und GRISZCZENKO, L., 1970: Diagnostika vospalenija plavatielnogo puzyrja. (Die Diagnose der Schwimmblasenentzündung). Rybovod.Rybolov., 13, 13.

KANAEV, A.J., LOBUNCOV, K.A., und NAUMOVA, A.M., 1967: Mikroflora i parazitofauna karpov, bolnych vospalenijem plavatielnogo puzyrja (VPP). (Die Mikroflora und Parasitenfauna von Karpfen, die an Schwimmblasenentzündung (SBE) erkrankten). Ryb.Choz., 43, 16.

KANAEV, A.J., KULIKOV, A.N., VASIL'EVA, E.A., NAUMOVA, A.M., und METELEV, V.V., 1963: Materialy etiologii, epizootologii i patogeneza novogo zabolevanija karpov. (Beiträge zur Ätiologie, Epizootologie und Pathogenese einer neuen Karpfenkrankheit).
Vsesojuz.sovesc.poleznjam ryb., 4, 48.

de KINKELIN, P., und SCHERRER, R., 1970: Le virus d'Egtved. I.-Stabilité, développement et structure du virus de la souche Danoise F_1.
Ann.Rech.rétér., 1, 17.

KOCYLOWSKI, B., 1965: The role of virus in septicemia of carp (Cyprinus carpio) and pox of carp, Influence of environment on infection.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 616.

KOCYLOWSKI, B., 1967: Ropne zapalenie pecherzy pawnych karpi. (Eitrige Entzündung der Schwimmblase bei Karpfen).
Gospodarka rybna, 19, 9.

KOCYLOWSKI, B., ANTYCHOWICZ, J. und ZELAZNY, J., 1970: Studies on the etiology and pathogenesis of carp swimbladder inflammation.
Riv.It.Piscic.Ittiopat., 5, 59.

KUDENCOVA, R.A., 1966: Predvaritelnyje dannyje po izuceniu etiologii bolezni plavatielnogo puzyrja karpov. (Vorläufige Untersuchungsergebnisse zur Ätiologie der Schwimmblasenerkrankung der Karpfen).
Simp. po parazit. i bolez. ryb. i vodnych bezpazvon. Moskau, 17.

KUDENCOVA, R.A., 1969: Ob. etiologii bolezni plavatielnogo puzyrja karpa. (Über die Ätiologie der Schwimmblasenentzündung der Karpfen).
Izv.Gos.Niorch., 69, 67.

KULOW, H., 1969: Orientierende Versuche zur therapeutischen Beeinflussung der Schwimmblasenentzündung des Karpfens.
Dtsch.Fischerei Ztg., 16, 58.

KULOW, H., und MATTHEIS, Th., 1969: Untersuchungen zur Pathologie und Therapie der Schwimmblasenentzündung des Karpfens.
Ztschr. Fischerei, N.F., 17, 237.

LIEBMANN, H., 1971: Der heutige Stand der Kenntnisse über die Infektiöse Bauchwassersucht des Karpfens.
In: "Die IBW", Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei-, und Flußbiologie.
Hrsgb.Prof.Dr.Dr.h.c.H. Liebmann, 20, 9.
Verlag Oldenbourg, München-Wien.

LOBUNCOV, K.A., 1966: Mikroflora karpov pri vospalenii plavatielnogo puzyrja. (Die Mikroflora von Karpfen mit Schwimmblasenentzündung).
Veterinarija, 42, 37.

LUKOWICZ von, M., 1972: Experience paper (Nr. 23) on swim-bladder inflammation in northern Bavaria.
In: Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control.
Organized by FAO/EIFAC with the support of OIE, Amsterdam, 11 March, 1972.

MARKIEWICZ, F., 1966 a: Zakazne schorzenie pecherza plawnego karpi. (Eine infektiöse Erkrankung der Schwimmblase beim Karpfen).
Medycyna Wet., 22, 16.

MARKIEWICZ, F., 1966 b: Schorzenie pecherza plawnego nowa choroba karpi. (Erkrankungen der Schwimmblase - eine neue Karpfenkrankheit).
Gospodarka rybna, 18, 8.

MARKIEWICZ, F., 1967: Przypadek schorzenia pecherza plawnego u szczupaka. (Ein Fall von Schwimmblasenerkrankung beim Hecht).
Gospodarka rybna, 19, 9.

MATTHEIS, Th., 1969: Ansichten zur Ätiologie der Schwimmblasenerkrankung des Karpfens.
Ztschr.Fischerei,N.F., 17, 263.

MATTHEIS, Th. und KULOW, H., 1967: Die Schwimmblasenerkrankung des Karpfens.
Dtsch.Fischerei Ztg., 14, 77.

MAYR, A., und BÖGEL, K., 1961: Der Chloroformresistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren.
Zbl.Bakt.I.Abt.Orig., 182, 564.

McCAIN, B.B., FRYER, J.L., und PILCHER, K.S., 1971: Antigenic Relationships in a Group of Three Viruses of Salmonid Fish by Cross Neutralization.
Proc.Soc.exp.Biol.Med., 137, 1042.

OBERMEIER, P., 1970: Die Schwimmblasenentzündung.
Allg.Fischerei-Ztg., 22, 757.

OTTE, E., 1966: Die eitrige Schwimmblasenentzündung des Karpfens.
Wien.Tierärztl.Monatschr., 53, 401.

OTTE, E., 1971: Die Schwimmblasenkrankheit eine Form der IBW?
In: "Die IBW", Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei-, und Flußbiologie.
Hrsgb.Prof.Dr.Dr.h.c.H.Liebmann, 20, 56.
Verlag Oldenbourg, München-Wien.

PLEHN, M., 1924: Praktikum der Fischkrankheiten.
Handbuch der Binnenfischerei Mitteleuropas, Demoll-Maier, 2, 421, 427.
E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

REICHENBACH-KLINKE, H.H., 1966: Krankheiten und Schädigungen der Fische.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

REICHENBACH-KLINKE, H.H., 1971: Einfluß äußerer Faktoren für die Entstehung der IBW.
In: "Die IBW", Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei-, und Flußbiologie.
Hrsgb.Prof.Dr.Dr.h.c.H.Liebmann, 20, 17.
Verlag Oldenbourg, München-Wien.

RUDIKOV, N.J., 1966: Polucenie kultur kletok i tkanej ryb ich primenienie pri ichtiopathologiceskich issledovanijach.
Trudy vsesojuznogo inst. eksperiment. veterinarii, Moskau, 32, 66.

SCHÄPERCLAUS, W., 1954: Fischkrankheiten. 3. Aufl., Akademie-Verlag, Berlin, 708.

SCHÄPERCLAUS, W., 1965: Etiology of infectious carp dropsy. Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 587.

SCHÄPERCLAUS, W., 1969: Virusinfektionen bei Fischen. In: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Hrsgb.H.Röhrer, VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena, V/2, 1067.

SCHWÖBEL, W., 1961: Die Bildung von Plaques durch das Virus der MKS unter methylzellulosehaltigen Medien. Ztschr.Naturforschg., 16 b, 479.

SZAKOLCZAI, J., 1964: A pontyck uszoholyaggyulladasa. (Die Schwimmblasenentzündung beim Karpfen). Halaszat, 10, 114.

SZAKOLCZAI, J., 1965: A ponty uszoholyaggyulladasa-Laboratoriumi vizsgalatok tübreben. (Die Schwimmblasenentzündung beim Karpfen - Ergebnisse von Laboruntersuchungen). Halaszat, 11, 176.

SZAKOLCZAI, J., 1967: Untersuchungen der Schwimmblasenentzündung bei Karpfen anhand von zwei Fällen in Ungarn. Ztschr.Fischerei, N.F., 15, 139.

TESARCIK, J., und HORAK, V., 1966: Zanet plynoveho mechyre (aerocystitis acuta) u karpi nasady (k_{1-2}) v Stredoceskem kraji. (Schwimmblasenentzündung (Aerocystitis acuta) bei K_{1-2} in Mittelböhmen). Bul.VUR Vodnany, 2, 15.

TOMASEC, I., 1972: Planel review on Infectious Dropsy of Cyprinids. In: Symposium (Nr. 4) on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Organized by FAO/EIFAC with the support of OIE, Amsterdam, 11 March, 1972.

TOMASEC, I., und FIJAN, N.N., 1965: The etiology of infectous dropsy of carp. Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 606.

VLADIMIROV, V.L., 1969: The method of long termretention of antibiotics in fish organism. Izvestiya of State Research Institute of Lake and River Fisheries, 69, 76.

VOLF, F., und HAVELKA, J., 1965: Investigation of the cause of the infectious dropsy (I.D.) of carp. Ann.N.Y.Acad.Sci., 126, 601.

WAGNER, M., 1967: Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. VEB Fischer Verlag, Jena.

WILNER, B.I., 1969: A classification of the major groups of Human and other animal viruses. 4.ed., p.p. 74, Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA.

WOLF, K., 1966: The fish viruses. Adv.Virus Res., 12, 35.

WOLF, K., 1970: Guidelines for virological examination of fishes. Spec. Publs. Am. Fish Soc., 5, 327.

WOLF, K., 1972: Advances in Fish Virology: a Review 1966-1971. In: "Diseases of Fish", Symposia of The Zoological Society of London, No. 30, Academic Press London-New York.

WOLF, K., und QUIMBY, M.C., 1962: Established eurythermic line of fishcells i n v i t r o. Science, 135, 1065.

WUNDER, W., 1949: Fortschrittliche Karpfenteichwirtschaft. E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 189.

WUNDER, W., 1966: Anormalitäten bei Fischen und ihre Ursache. 7. Abgeänderte Körpergestalt und abgeändertes Verhalten beim Karpfen nach einer Schwimmblasenverletzung. Allg. Fischerei-Ztg., 91, 641.

ZÖBE, E., 1952: Histologische Untersuchungen über die infektiöse Bauchwassersucht des Karpfens. Diss.Tierärztl.Fakultät, München.

ZWILLENBERG, L.O., JENSEN, M.H., und ZWILLENBERG, H.H.L., 1965: Electro microscopy of the virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (Egtved virus). Arch.ges.Virusforsch., 17, 1.

ZWILLENBERG, L.O., JENSEN, M.H., und ZWILLENBERG, H.H.L., 1966: Electron microscopy and classification of the virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout. Bull.Off.int.Epiz., 65, 987.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung des vortrefflichen Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. P.A. Bachmann für die jederzeit gewährte Unterstützung und die Betreuung der Abhandlung.

Herrn Prof. Dr. H. Reichenbach-Klinke bin ich außerdem für wertvolle Anregungen zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 31. März 1939 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Gustav Ahne und seiner Ehefrau Gertha, geb. Nitsche, in Tetschen/Sudetenland geboren.
1947 kam unsere Familie infolge Kriegsauswirkungen nach Maihingen (Bayern).
Von 1945 - 195o besuchte ich die Grundschule in Steinschönau (CSSR) und in Maihingen (Bayern), von 195o - 1954 das humanistische Gymnasium in Bad Wurzach (Wttbg.).
Nach dreijähriger Drogistenlehre, Gehilfenprüfung und Besuch der Drogistenakademie, arbeitete ich als technischer Angestellter bei einer pharmazeutischen Firma.
Von 196o - 1961 leistete ich meinen Wehrdienst in Degerndorf (Bayern) ab. Anschließend war ich bis 1968 in kaufmännischen Stellungen und als Ärzteberater der chemisch-pharmazeutischen Industrie tätig.
Im Jahre 1967 legte ich beim Kultusministerium in München das Begabtenabitur ab.
Im Wintersemester 1967/68 begann ich an der Universität München das Studium der Biologie und bestand im August 197o die Biologie-Diplomvorprüfung.

Seit dem 4. Mai 1964 bin ich verheiratet; am 6. Januar 1971 wurde unsere Tochter geboren.